

**Zeszyt Studentów Biotechnologii**

# ACTA MYGENICA

numer 11

Kraków, luty 2017

## **Zespół redakcyjny**

Dobrochna Dolicka  
Justyna Kadłuczka  
Oliwia Koczy  
Agnieszka Seretny  
Aleksandra Siedlecka  
Daniel Talar

## **Okładka**

Fibroblasty wtórne z włóknami macierzy zewnątrzkomórkowej w hodowli 2D.  
Barwienie: macierz zewnątrzkomórkowa - Col-F (zielony), mitochondria - TMRE  
(czerwony), jądra komórkowe - DRAQ5 (niebieski). Zdjęcie autorstwa dr Ewy  
Bieli. Wykonano w Zakładzie Biofizyki Komórki na Wydziale Biochemii,  
Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego.

## **Skład**

Kinga Pajdzik  
Wiktor Tokarek  
Dobrochna Dolicka

## **Korekta**

Zespół redakcyjny

## **Wydawca**

KNSB Mygen

**Nakład 500 szt.**

## **Kontakt**

dobrochna\_d@wp.pl

**ISSN 1899-5535**

**Sfinansowane przez:**



RADA KÓŁ NAUKOWYCH  
UNIwersytetu  
JAGIELLOŃSKIEGO

## **Od redakcji**

DRODZY CZYTELNICY!

Witamy Was na łamach kolejnego numeru Acta Mygenica. Tym razem zachęcamy do zapoznania się z najnowszymi doniesieniami ze świata nauki: szczepionką na Ebolę, nagrodą Nobla za autofagię czy wiązaniami węgiel-krzem. W jedenastym numerze można znaleźć także relację z konferencji Bio Chem Med Session w Gdańsku oraz liczne artykuły o tematyce biotechnologii i biologii molekularnej.

Życzymy miłej lektury!

ZESPÓŁ REDAKCYJNY



# PUZZEL

## Wrocławska Konferencja Studentów Nauk Technicznych i Ścisłych

Zapraszamy do udziału w VI Wrocławskiej Konferencji Studentów Nauk Technicznych i Ścisłych Puzzel 2017, która odbędzie się w dniach 1-2 kwietnia 2017. Zapisy trwają od 20 listopada do 3 marca. Nie przegap, zapisz się już dziś!

Prowadzisz ciekawe badania i chciałbyś przedstawić ich wyniki szerszej grupie osób? Chcesz wymienić się doświadczeniem i podzielić się swoimi zainteresowaniami naukowymi? Właśnie w tym celu powstała Wrocławska Konferencja Studentów Nauk Technicznych i Ścisłych!

Do udziału w Konferencji zapraszamy wszystkich studentów nauk technicznych, ścisłych, przyrodniczych oraz medycznych. Konferencja powstała z myślą o zintegrowaniu wrocławskiego środowiska aktywnych naukowo studentów. Puzzel 2017 stanowi miejsce spotkań młodych ludzi rozpoczynających dopiero swoją karierę naukową.

W ramach Konferencji uczestnicy przedstawią swoje badania i zainteresowania w wygłaszanych referatach i zaprezentowanych plakatach. Odbędą się także wykłady, poprowadzone przez naukowców z wrocławskich uczelni. Będzie również możliwość spotkania się z przedstawicielami firm zainteresowanych rozwojem nauki i nowych technologii.

Dla autorów najbardziej interesujących plakatów i referatów przewidziane są nagrody, a wszyscy uczestnicy zostaną zaproszeni na specjalną imprezę integracyjną.

Termin zgłoszenia czynnego uczestnictwa mija 3 marca. Nie zwlekaj, zgłoś się już dziś!

Więcej informacji znajduję się na [www.puzzel.plusuj.pl](http://www.puzzel.plusuj.pl)

więcej informacji znajdziesz na:

[msb.symbioza.edu.pl](http://msb.symbioza.edu.pl)

[facebook.com/msbsymbioza](https://facebook.com/msbsymbioza)

symbioza  
VI edycja

26-28 maja  
SGGV



## Z życia koła

Poprzedni numer Acta Mygenica został wydany we wrześniu, mamy więc za sobą prawie cały semestr zimowy. Koło zaczęło rok akademicki od organizacji spotkania dla studentów pierwszego roku. Tak jak katalizator zmniejsza energię aktywacji reakcji, tak Koło chciało zminimalizować wysiłek na starcie nowego etapu w życiu nowych studentów WBBiB, m.in. odkrywając tajemnice USOSa, pomagając w wyborze kursów dodatkowych czy przybliżając sylwetki niektórych wykładowców. Krótco później odbyło się Walne Zebranie Koła, na którym Zarząd omówił plan na zbliżający się rok akademicki.

Jednym z punktów owego planu był wyjazd naukowo-integracyjny do Mszany Dolnej, na którym gościliśmy dra Grzegorza Kreinera, adiunkta w Zakładzie Biochemii Mózgu w Instytucie Farmakologii PAN. Dr Kreiner mówił o modelach zwierzęcych wykorzystywanych w badaniach naukowych. W listopadzie odbyła się kolejna edycja Międzynarodowej Konferencji Studentów Biotechnologii, na którą do Gdańska pojechała liczna grupa studentów naszego wydziału. Wyróżnienie za prezentację ustną otrzymała Ola Kopacz, a w części posterów doceniona została aktualna prezes Irma Gryniuk, również otrzymując wyróżnienie. W trakcie cotygodniowych seminariów prezentowali zarówno studenci (Kajetan Sawa, Magdalena Firlej, Paulina Nowak, Szymon Krupa), doktoranci (Marcin Luty), jak i goście zewnętrzni w osobie Kai Milanowskiej z firmy bioinformatycznej Ardigen. W trakcie naszych spotkań mieliśmy też okazję

posłuchać przedstawicieli różnych zakładów naszego Wydziału. Dla młodych jest to okazja by dowiedzieć się jak wygląda tam praca, by znaleźć odpowiednie dla siebie miejsce na pracę licencjacką czy magisterską. Nie zabrakło też starszych osób, które chciały po prostu wiedzieć co się dzieje w innych zakątkach wydziału. Koło brało także udział w organizacji inicjatywy Garażu Złożoności, czyli konferencji GoC@FAiS 2016.

Mygen to nie tylko nauka, ale też paczka dobrych znajomych. Aby zacieśnić więzy przede wszystkim pojechaliśmy na Mszanę do Mszany. Nową inicjatywą był wieczorek kulturowy, w trakcie którego liczni studenci pochodzący spoza Polski mieli okazję opowiedzieć coś o swojej ojczyźnie i podzielić się tradycyjnym daniem. Wybraliśmy się na niemal tradycyjne już łyżwy, a wraz z członkami Koła Biofizyków Nobel spotkaliśmy się ostatni raz przed przerwą świąteczną na wspólnej wigilii. Teraz, po krótkim, lecz intensywnym wypoczynku jesteśmy gotowi do zmagania z sesją i kolejnymi wyzwaniem w laboratorium!

*Kajetan Sawa*

# Podsumowanie międzynarodowej konferencji „BIO CHEM MED SESSION”

Konferencja „Bio Chem Med Session” została zorganizowana przez Akademickie Stowarzyszenie Studentów Biotechnologii (ASSB) w dniach 25-27.11.2016 w Gdańsku. Udział w niej umożliwił uczestnikom wzbogacenie swojej wiedzy o informacje z zakresu wielu dziedzin powiązanych z naukami przyrodniczymi – prym wiodły: biotechnologia medyczna, inżynieria genetyczna, biologia molekularna, immunologia oraz biochemia.



W konferencji wzięło udział pięcioro członków naszego Koła. Zaprezentowaliśmy postery zarówno badawcze, jak i przeglądowe. Jeden z naszych posterów szczególnie zaciekał uczestników treścią i został wyróżniony za innowacyjne podejście do tematu. Poster ten został przygotowany przez Irmę Gryniuk i dotyczył przeszczepów mikrobiomu u człowieka („Microbes in medicine: Faecal Microbiota Transplantation results in the treatment of ulcerative colitis”). Gratulujemy!

Pozostali członkowie naszego Koła zaprezentowali następujące tematy:

- a) „Epigenetic Mechanisms Controlling Obesity” (Dobrochna Dolicka)
- b) “Seeing brain” (Kajetan Sawa)

c) “Dextran derivatives as novel inhibitors of herpes simplex viruses” (Aleksandra Synowiec)

d) “Current state of the art on Arabidopsis thaliana de-etiolation – 77K fluorescence spectroscopy” (Wiktor Tokarek).

W dniach 26 oraz 27 listopada odbywały się prezentacje ustne. Znakomita większość z nich była przygotowana na bardzo wysokim poziomie, wyróżnienie tylko czterech wystąpień na pewno było nie lada wyzwaniem dla Komisji. Po długich debatach ogłoszono werdykt:

1 miejsce: Kamila Szafulera (Politechnika Łódzka) – „Dextran-based hydrogels for biological applications: synthesis and characterization”

2 miejsce: Michał Stachowiak (Gdański Uniwersytet Medyczny) – „Novel insight in cell-type related gene expression and cell cycle progression in vascular inflammation”

3 miejsce: Aleksandra Szybiak (Gdański Uniwersytet Medyczny) – “Exposure to anthropogenic chemicals with endocrine-disrupting activity and their impact to women’s health”

Wyróżnienie: Aleksandra Kopacz (Uniwersytet Jagielloński) - “microRNA-3‘a is a guard determining the fate of dysfunctional Nrf2-deficient endothelial cells”.

Sesja posterowa odbyła się 26 listopada. Składała się ona z 50 posterów, które były oceniane przez jedną z dwóch komisji według ściśle określonych



nych kryteriów. Na podstawie punktacji wyłoniono cztery osoby, które uzyskały wyróżnienia:

1 miejsce: Sebastian Wawrocki (Uniwersytet Łódzki) - „Association of cytokine gene polymorphism with pulmonary tuberculosis in adults in Poland”

2 miejsce: Anna Kuśmierska (Uniwersytet Łódzki) - „Filamentous fungi from the genus *Metarhizium* as a tool in triazine pesticides degradation”

3 miejsce: Artur Jędrzak (Politechnika Poznańska) - “Functional glucose biosensor based on advanced silica/lignin hybrid material”

Wyróżnienie: Irma Gryniuk (Uniwersytet Jagielloński) - "Microbes in medicine: Faecal Microbiota Transplantation results in the treatment of ulcerative colitis”

Wszystkim nagrodzonym gratulujemy! Członkowie naszego Koła, którzy uczestniczyli w tej Konferencji, uznali

ją za dobrze zorganizowaną i wyrazili ochotę do wzięcia udziału w następnych edycjach. Mamy także nadzieję, że zdobyte doświadczenie także będzie pomocne przy organizacji naszej konferencji studenckiej „Genomica”, której trzecia edycja odbędzie się w tym roku.



Chcielibyśmy podziękować Organizatorom za ciepłe przyjęcie i mamy nadzieję, że spotkamy się w Krakowie już w maju na naszej konferencji.

*Aleksandra Synowiec*

## Nowinki ze świata nauki

### SKUTECZNA SZCZEPIONKA NA WIRUSA EBOLA

Pierwszy potwierdzony przypadek zachorowania na Ebolę w populacji ludzkiej miał miejsce w roku 1976, wówczas równocześnie wystąpiły dwie epidemie – jedna w Nzara (Południowy Sudan), natomiast druga w Yambuku (Demokratyczna Republika Kongo), niedaleko rzeki Ebola (stąd też pochodzi nazwa tego wirusa). Transmisja patogenu odbywa się przy bezpośrednim kontakcie z krwią, płynami ustrojowymi lub innymi wydzielinami osoby chorej, bądź też zarażonych, martwych

zwierząt np. szympanсів, nietoperzy, antylop leśnych czy jeżozwierzy. Okres inkubacji (czyli czas od zarażenia do wystąpienia pierwszych objawów) trwa od 2 do 21 dni, a chorzy nie zarażają innych osób dopóki nie rozwiną się pierwsze objawy choroby takie jak: gorączka, bóle mięśni, gardła i głowy. Późniejszymi objawami są wymioty, biegunka, wysypka, upośledzenie czynności wątroby i nerek, a w wielu przypadkach również dochodzi do krwotoków wewnętrznych i zewnętrz-



nych. Śmiertelność tej choroby waha się od 25% do 90% w zależności od szczepu [1]. W związku z zagrożeniem, jakie niesie choroba, opracowanie preparatu, który ma tak wysoką skuteczność zapobiegania zachorowaniom, jak rVSV-ZEBOV (ang. *recombinant vesicular stomatitis virus-Zaire Ebola virus*), daje nam szansę na ogromny krok do przodu w walce z gorączką krwotoczną Ebola.

Od 1976 roku, kiedy wystąpiła pierwsza epidemia Eboli, aż do teraz nie było skutecznej szczepionki na tę chorobę. Dopiero rok temu naukowcy z Narodowego Laboratorium Mikrobiologicznego w Kanadzie na łamach czasopisma *Lancet* opublikowali swoje wyniki dotyczące szczepionki rVSV-ZEBOV, które pokazywały, że zaszczepienie w bardzo krótkim czasie po kontakcie z wirusem skutkowało nierozwinięciem objawów chorobowych. Aktualnie ci sami naukowcy opublikowali swoje wyniki przeprowadzone na większej próbie badawczej obejmującej prawie 6 tys. osób, badania wskazują na 100% skuteczność preparatu. W szczepionce rVSV-ZEBOV wykorzystano zmodyfikowane genetycznie wi-

rusy pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej (skrót: VSV), które na powierzchni posiadają charakterystyczne dla wirusa Ebola glikoproteiny. Umożliwia to rozpoznanie tych glikoprotein przez nasz układ immunologiczny oraz nabycie umiejętności zwalczania ich - w razie faktycznego zakażenia ZEBOV. Taki preparat, opracowany przez naukowców okazał się niezwykle skuteczny w walce z wirusem Ebola. Niestety, prawie połowa osób, które otrzymały szczepionkę odczuwała przynajmniej jeden z efektów ubocznych w postaci bólu stawów, głowy, mięśni czy też poczucia zmęczenia. Dwie osoby zareagowały na szczepionkę wysoką gorączką i alergią, jednak naukowcy zapewniają, że preparat jest bezpieczny i można go stosować zarówno u dorosłych jak i u dzieci. W grupie osób niezaszczepionych zachorowały aż 23 osoby [2]. W związku z obiecującymi wynikami i skutecznością szczepionki firma Merck, która aktualnie posiada licencję na produkcję rVSV-ZEBOV, przygotowuje 300 tys. sztuk preparatu w razie wybuchu kolejnej epidemii.

*Aleksandra Synowiec*

### **Bibliografia:**

- [1]<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs103/en/> [dostęp: 04.01.2017]
- [2] Henao-restrepo AM i wsp., Efficacy and effectiveness of an rVSV-vectored vaccine

in preventing Ebola virus disease: final results from the Guinea ring vaccination, open-label, cluster-randomised trial (Ebola Ça Suffit!). *Lancet*. 2017;389(10068):505-518.

## NOBEL ZA AUTOFAGIĘ

Informacja o otrzymaniu Nobla 2016 w dziedzinie medycyny i fizjologii zaskoczyła Yoshinori Ohsumiego, 71-letniego naukowca z *Tokio Institute of Technology*, podczas w pracy w laboratorium, gdzie wykonywał swoje badania. Nagroda została mu przyznana za odkrycia dotyczące mechanizmów autofagii (łac. *auto* – samo, *phagein* – jeść, autofagia=samozjadanie), która polega na usuwaniu przez komórkę własnych zbędnych części składowych przez proteolityczną degradację. Może to dotyczyć uszkodzonych białek, organelli komórkowych, bądź też struktur, które przestały spełniać swoją prawidłową funkcję. Wszystkie odpady komórkowe otaczane są podwójną błoną tworząc pęcherzyk zwany autofagosomem, który łączy się z lizosomem zawierającym w sobie kwaśne enzymy trawiące białka, węglowodany i tłuszcze. Po ich połączeniu i zlaniu się ze sobą, dochodzi do degradacji i rozłożenia zawartości na prostsze składniki, które mogą zostać ponownie wykorzystane przez komórkę jako składniki odżywcze lub elementy budulcowe. W ten właśnie sposób może dojść do komórkowego recyklingu.

Do badania procesu autofagii użyto drożdży, skupiając się na białkowej degradacji w wakuolach – organellach, które odpowiadały lizosomom w ludzkich komórkach. Te z gatunku *Saccharomyces cerevisiae* są stosunkowo często używanym modelem, na którym identyfikuje się geny ważne w różnych szlakach komórkowych. Ze względu

jednak na ich niewielki rozmiar i niełatwo rozróżnialne pod mikroskopem wewnętrzne struktury, obawiano się, czy w takich organizmach w ogóle istnieje ten proces i czy będzie można go łatwo zaobserwować. Wyhodowano komórki, które nie zawierały enzymów degradujących zawartości wakuoli i głodzono je, stymulując w ten sposób autofagię, co doprowadziło do zebrania się autofagosomów w wakuolach i potwierdzenia istnienia tego procesu w przypadku drożdży.

W kolejnym kroku potraktowano komórki drożdży różnymi związkami chemicznymi powodującymi mutacje i indukowano autofagię. Dokonano identyfikacji 15 kluczowych dla tego procesu genów, które (jako, że jest to bardzo konserwatywna rodzina genów) mają swoje odpowiedniki u człowieka. Ponadto badano, jak czynniki stresowe wpływają na autofagię a także jakie są mechanizmy działania białkowych kompleksów na formowanie się autofagosomu.

Badania te otworzyły drogę do zrozumienia autofagii w wielu fizjologicznych procesach, chociażby takich, jak odpowiedzi komórek na stan zapalny. Ponadto sam proces ma wpływ na wiele chorób neurologicznych, nowotworowych i autoimmunizacyjnych, mówi się o jego powiązaniu z chorobą Parkinsona oraz cukrzycą typu II. Mimo, że proces autofagii był znany od ponad 50 lat, dopiero po odkryciu Yoshinori Ohsumiego doceniona została jego ważność w fizjologii i medycynie.

*Olga Roman*

## Bibliografia:

[1] [https://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/2016/press.html](https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2016/press.html)  
[dostęp: 30.12.2016]

[2] <http://www.nature.com/news/medicine-nobel-for-research-on-how-cells-eat-themselves-1.20721> [dostęp: 30.12.2016]

# KRZEM I WĘGIEL, DWA BRATANKI, CZYLI O ENZYMATYCZNEJ SYNTEZIE ZWIĄZKÓW KRZEMOORGANICZNYCH

Związki krzemoorganiczne, czyli związki zawierające wiązanie węgiel-krzem (C-Si), są szeroko stosowane w przemyśle chemicznym oraz budowlanym (np. silikon). Pomimo wysokiej zawartości krzemu w skorupie ziemskiej i pewnego chemicznego podobieństwa do węgla, nie są znane formy życia zdolne do wytwarzania wiązań węgiel-krzem [1,2]. Zarówno atomy węgla, jak i krzemu są czterowartościowe, jednak nie tworzą one wiązań chemicznych w jednakowy sposób, co wynika z większego promienia atomu krzemu oraz dostępności orbitali 3d. Przekłada się to na zmniejszenie energii dysocjacji wiązania C-Si (435 kJ/mol) w porównaniu z wiązaniem C-C (607 kJ/mol). Ponadto, krzem jest bardziej elektrododatni i jest lepszym akceptorem wodoru niż węgiel [3].

Otrzymywanie chiralnych związków krzemoorganicznych o danej konfiguracji wiązania jest trudnym zadaniem, wymagającym wieloetapowej ścieżki syntezy i przygotowania chiralnych reagentów. Obecnie stosowane metody enancjoselektywnego wprowadzania karbenów ( $:CR_1R_2$ ) do ugrupowań silanowych bazują na wykorzystaniu chiralnych kompleksów zawierających

rod, iryd czy miedź [1,4]. Ograniczenia tych metod powodują jednak konieczność poszukiwania nowych sposobów syntezy związków krzemoorganicznych. Jednym z podejść jest wykorzystanie reakcji enzymatycznych.

Wcześniejsze badania pokazały, że białka hemowe, takie jak mioglobina czy też cytochrom P450, mogą katalizować reakcję wprowadzania karbenów w wiązania N-H i S-H, co nie jest ich naturalną funkcją [3]. Z tego powodu Kan i wsp. zdecydowali się przeprowadzić eksperyment mający na celu sprawdzenie, czy białka hemowe są zdolne do syntezy wiązań C-Si. W pierwszych doświadczeniach wykazali, że wolny hem może służyć jako katalizator dla reakcji między fenyloдимetylosilanem a 2-diazopropionianem etylu w roztworze wodnym. Produkt, zawierający wiązanie C-Si, powstał w temperaturze pokojowej, jednak z niską wydajnością i w formie mieszaniny racemicznej [1]. Po przebadaniu różnych wariantów mioglobiny i cytochromów c, odkryto, że cytochrom c pochodzący z *Rhodothermus marinus*, Gram-ujemnej, termofilnej bakterii, katalizuje powyższą reakcję ze stosunkowo wysoką wydajnością. Jednakże w tym przypadku osiągnięto doskonałą

enancjoselektywność – wartość nadmiaru enancjomerycznego, tj. stosunku różnicy zawartości enancjomerów do sumy ich zawartości w mieszaninie, wyniosła 97%. Jest to najwyższy taki wskaźnik pośród wszystkich badanych cytochromów c [1]. Kan i wsp. postanowili wykorzystać ukierunkowaną mutagenezę do stworzenia doskonałego enzymu, zdolnego do tworzenia wiązań C-Si. W tym celu wytworzyli mutanty tego białka, w których wprowadzono różne substytucje metioniny w pozycji 100 (M100) – aminokwasu biorącego udział w koordynacji żelaza hemowego [1].

Następnie zbadano aktywność lizatów komórek *E. coli*, w których ekspresjonowano dany wariant enzymu. Mutacja M100D pozwoliła na 12-krotne zwiększenie wydajności reakcji w porównaniu do wyjściowego enzymu, z zachowaniem enancjoselektywności. W dalszym etapie eksperymentów używany został potrójny mutant enzymu, V75T M100D M103E, odznaczający się znakomitą wydajnością tworzenia związków krzemoorganicznych, specyficznością do formowania wiązań C-Si oraz wartością nadmiaru enancjome-

rycznego wynoszącą >99%. Ponadto, enzym ten jest zdolny do formowania 20 produktów zawierających wiązania C-Si. Warto podkreślić, że aktywność tego potrójnego mutantu 15-krotnie przewyższa najlepsze katalizatory chemiczne! [1]. Wykazano także, że enzym ten może przeprowadzać reakcje syntezy związków krzemoorganicznych *in vivo*. Przykładowo, wykorzystując nietknięte komórki *E. coli*, zawierające wariant enzymu z potrójną mutacją, możliwa jest synteza 2-((4-aminofenylo)dimetylosilylo)propionianu etylu z nadmiarem enancjomerycznym wynoszącym 98% [1].

Opisane badania ilustrują, w jaki sposób można wykorzystać naturalnie występujące enzymy i dostosować je do przeprowadzania reakcji, które normalnie nie występują w przyrodzie. Otwiera to nowe możliwości wykorzystania białek jako biokatalizatorów w przemyśle związków krzemoorganicznych, a także nowe pola do rozważań nad rolą krzemu w biologii i ewolucji [1,3].

Wiktor Tokarek

#### **Bibliografia:**

- [1] Kan SB i wsp., Directed evolution of cytochrome c for carbon-silicon bond formation: Bringing silicon to life. *Science*. 2016;354(6315):1048-1051.
- [2] Frampton MB i wsp., Organosilicon biotechnology. *Silicon*. 2009;1(3):147-163.
- [3] Ducharme J i wsp., Enzymes beat

chemists in the formation of unnatural bonds. *Chembiochem*. 2016 (w druku).

- [4] Klare HF i wsp., Teaching nature the unnatural. *Science*. 2016;354(6315):970.

# WIRUSY, KTÓRE POMOGŁY NAM STAĆ SIĘ LUDŹMI

Jeśli by definiować człowieka głównie na podstawie tego, co ma w głowie (tak też powinno być, bo fizjologią nie różnimy się wiele od świni) warto zdać sobie sprawę, że moglibyśmy nie osiągnąć tak dobrych rezultatów jako gatunek, gdyby nie te małe, zniechęcone przez nas twory. Mowa tutaj o wirusach, a dokładniej tych przechowujących swój genom w postaci RNA czyli retrowirusach. Jak wiadomo od paru lat, ich genomy włączały się (i robią to nadal) do genomów różnych organizmów. Ta inkorporacja na przestrzeni milionów lat doprowadziła do tego, że obecnie w ludzkim genomie znajduje się 8-10% DNA pochodzenia retrowirusowego z czego ok 2% w obszarach odpowiedzialnych za rozwój struktur mózgu. Początkowo uważano, że nie ma to znacznego wpływu na nasze organizmy, jako że obszary „zajmowane” przez to DNA to tzn. junk-DNA czyli śmieciowe, nie będące przedmiotem aktywnej ekspresji. Jednak jak wskazują wyniki wielu badań, było to błędne przekonanie. Co raz głośniej mówi się o olbrzymim wpływie DNA niekodującego na wiele

procesów zachodzących w komórce. Grupa profesora Johana Jakobssona z Lund University w Szwecji odkryła, że sekwencje wirusowe mogą stanowić platformę dokującą m.in. dla białka TRIM28. Białko to ma zdolność do wyłączania rozpoznawanych przez siebie genów. Jednak jak się okazuje wyciszeniu ulegają również geny sąsiadujące z wirusowym insertem, dzięki czemu obecność wirusa wpływa na ekspresję innych białek. Uważa się, że wiele wirusów specyficznych tylko dla przodków naczelnych włączyło się do ich genomów ok. 35-45 milionów lat temu, co koreluje z wyodrębnieniem się wielu linii. Profesor Jakobsson sądzi, że do poznania przyczyn naszego wyjątkowego postrzegania świata niezbędne jest określenie mechanizmów, za pomocą których zmieniły się struktury naszych neuronów, a co za tym idzie, mózgów. Twierdzi on, że owych przyczyn powinniśmy szukać właśnie w tych małych insertach, które drastycznie wpłynęły na naszą ewolucję.

*Piotr Tokarz*

## **Bibliografia:**

[1] Brattås i wsp., TRIM28 Controls a Gene Regulatory Network Based on Endogenous Retroviruses in Human Neural Progenitor

Cells, Cell Reports, 2017.

[2] [www.sciencedaily.com/releases/2017/01/170112110840.html](http://www.sciencedaily.com/releases/2017/01/170112110840.html) [dostęp: 16.01.2017]



Koło Naukowe Genetyki oraz Koło Naukowe  
Studentów Biotechnologii „Mygen”  
działające przy Uniwersytecie Jagiellońskim  
serdecznie zapraszają studentów wszystkich  
stopni oraz doktorantów na



## III Studencką Konferencję Genetyczną



Konferencja obejmuje genetykę wszystkich organizmów zarówno na poziomie pojedynczych osobników jak i całych populacji. Zaproszenie skierowane jest do młodych badaczy i pasjonatów z kierunków przyrodniczych interesujących się różnymi dziedzinami genetyki, zarówno prowadzących własne badania jak i dopiero zaczynających swoją przygodę z nauką.

**Konferencja odbędzie się w dniach 12 - 13 maja 2017r. w Krakowie**  
w Instytucie Zoologii Uniwersytetu Jagiellońskiego przy ul. Gronostajowej 9.

### Rejestracja już ruszyła!

**Zgłoszenia uczestników będą przyjmowane do 18 kwietnia 2017r.**  
**Termin nadsyłania abstraktów upływa także 18 kwietnia 2017r.**

Opłata konferencyjna wynosi 70 zł. Zgłoszenia są przyjmowane drogą elektroniczną.  
Formularz rejestracyjny oraz wszelkie informacje znajdują się na stronie:

**[www.genomica.pl](http://www.genomica.pl)**

Masz pytanie? Napisz do nas!

✉ [genomica.uj@gmail.com](mailto:genomica.uj@gmail.com)



## **Spis treści:**

### **Historia hipotezy sygnałowej i znaczenie komórkowego adresowania białek**

Jakub Knurek, Magdalena Durda 16

### **Post-transkrypcyjne modyfikacje RNA**

Kinga Pajdzik, Martyna Wasilewska 26

### **Biologia i fizjologia *Janthinobacterium lividum***

Wiktor Tokarek, Stanisław Listwan 33

### **Nanocząstki złota - piękne i mądre, czyli wykorzystanie nanozłota do konstrukcji sond molekularnych i w diagnostyce**

Olga Perzanowska 43

### **Ewolucyjna biologia rozwoju a paleontologia**

Edwin Sieredziński 49

### **Alternatywne źródła serc do przeszczepów**

Anna Jędrzejak 57

### **Selekcyjonizm genów Dawkinsa cztery dekady później**

Edwin Sieredziński 65

# Historia hipotezy sygnałowej i znaczenie komórkowego adresowania białek

Jakub Knurek, Magdalena Durda

Koło Naukowe Biochemików

Zakład Biochemii

Wydział Biologii i Biotechnologii

Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

knurekjakub@op.pl

Praca napisana pod opieką dr hab. Magdaleny Staszczak

**W celu zachowania homeostazy organizmu systemy kontroli z udziałem receptorów zmuszają komórki do ciągłej produkcji i degradacji makrocząsteczek, których szczególnym przykładem są białka. Działają one wielotorowo, wpływając na wiele różnych procesów komórkowych. Jednak żeby dostać się w odpowiednie miejsce potrzebują "drogowskazu" kierującego do miejsca docelowego działania. Tę rolę pełnią właśnie sekwencje sygnałowe (od kilku do kilkudziesięciu reszt aminokwasów), które są swego rodzaju "adresem" danego polipeptydu. Informują one o tym, w jakiej części komórki powinno znaleźć się dane białko.**

**Wyróżniamy dwa rodzaje sekwencji sygnałowych: sekwencje o specyficznej kolejności reszt aminokwasowych i sekwencje o specyficznej strukturze tworzonej w procesie fałdowania. Niektórzy postulują, iż od konkretnego układu aminokwasów istotniejszy jest charakter ciągu aminokwasowego determinujący kształt danego białka po sfałdowaniu. Obecność sekwencji sygnałowej jest warunkiem niezbędnym do skierowania białka do konkretnego przedziału komórkowego. Historia poznania tego zjawiska zajęła ponad dwadzieścia lat kart dziejów nauki i stanowi jedno z najdonioślejszych odkryć w dziedzinie biologii komórki. Związana jest ona nierozdzielnie z Uniwersytetem Rockefellera w Nowym Jorku, a szczególnie z Günterem Blobelem, który otrzymał Nagrodę Nobla w dziedzinie medycyny i fizjologii w 1999 roku.**

## Wstęp

Homeostaza, czyli zdolność do utrzymania metabolizmu komórek w stanie adekwatnym do czynników na nie działających, to niezbędny warunek zdrowia całego organizmu. Pozwala ona na prawidłowe funkcjonowanie komórek. Zachowanie homeostazy organizmu wymaga holistycznego systemu kon-

troli receptorowej oraz ciągłego ruchu substancji między i poza komórkami. Ruch ten zapewniany jest przez czynny lub bierny transport. Jest to molekularna sieć zależności gwarantująca stabilizację wartości parametrów, które sprawują nadzór nad procesami syntezy i degradacji wszystkich czą-

stek stanowiących budulec struktur komórkowych.

Białka to podstawowe cegiełki życia. Zalicza się je do elementarnych składników komórek i od ich stężenia zależy także utrzymanie homeostazy danej tkanki. Powstają one w wyniku "przeписania informacji genetycznej" z DNA na pre-mRNA w procesie transkrypcji, a po obróbce transkryptu - z mRNA na polimer aminokwasowy, który następnie ulega fałdowaniu, modyfikacjom potranslacyjnym oraz łączeniu z komponentami niebiałkowymi, dając funkcjonalną makromolekułę. Ten skomplikowany proces jest w komórkach eukariotycznych rozdzielony w czasie i przestrzeni. Proces translacji, w wyniku którego powstaje łańcuch polipeptydowy, zachodzi na rybosomach znajdujących się w cytoplazmie, a wiele białek jest wydzielanych poza obręb komórki lub lokalizowanych w organellach. Swego czasu naukowcy postawili sobie pytanie, w jaki sposób adresowane są białka i na jakiej drodze zachodzi ich transport do miejsc przeznaczenia?

## **Historia odkrycia sekwencji sygnałowej**

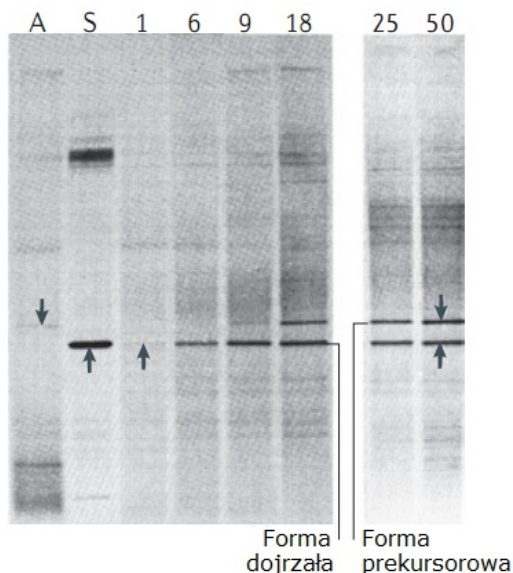
Instytut Rockefellera w Nowym Jorku może poszczycić się liczną grupą badaczy uhonorowanych Nagrodą Nobla w dziedzinie fizjologii i medycyny. Do tego grona należą m.in. Albert Claude, Christian de Duve oraz George Emil Palade, którzy otrzymali to wyróżnienie w 1974 roku „za innowacje w mikroskopii elektronowej oraz frakcjonowanie komórkowe, które położyło

podwaliny ówczesnej molekularnej biologii komórki, czego najbardziej prominentnym osiągnięciem było odkrycie rybosomów na retikulum endoplazmatycznym i opisanie go po raz pierwszy w 1955 r.” [1]. W celu zachowania chronologii wydarzeń cofniemy się jednak aż do czasów po II wojnie światowej. W 1945 r. Keith Porter wraz z Albertem Claudem rozpoczął pionierskie badania mikroskopowe. Odkrył i nazwał retikulum endoplazmatyczne (ER, ang. *Endoplasmic Reticulum*), czym zapoczątkował powstanie nowej dziedziny biologii – biologii komórki [2]. Wydarzenia w świecie nauki już w tamtym czasie toczyły się szybko i kolejne lata badań przyniosły doniosłe rezultaty. Albert Claude za pomocą mikroskopii elektronowej opisał mitochondria [3, 4]. Christian de Duve odkrył lizosomy [5] oraz peroksosomy [6]. Natomiast George Palade, student Claude’a, rumuński naukowiec, wraz ze swoim zespołem skupił się na problemie wewnątrzkomórkowego transportu białek. W 1955 r. pogłębił badania Portera i zaobserwował szorstką siateczkę śródplazmatyczną (RER, ang. *Rough Endoplasmic Reticulum*) [7, 8]. Kolejne doświadczenia prowadzone na Uniwersytecie Rockefellera wykazały, że białka wydzielnicze znajdują się nie tylko w cytoplazmie komórkowej, ale także w mikrosomach będących częścią RER [9]. Badania te doprowadziły do utworzenia nowego zespołu naukowego, do którego dołączyli Colvin Redman i David Sabatini. Badacze pod kierownictwem Palade’a potwierdzili, że rybosomy wykazują oddziaływania

względem mikrosomów błonowych [10, 11]. Pod koniec 1966 r. do Sabatiniego dołączył jeszcze jeden naukowiec młodej fali, Günter Blobel, który znacząco przyczynił się do stworzenia modelu kierowania białek do odpowiednich kompartmentów komórkowych. W kwietniu 1971 r., w czasie konferencji naukowej w Gatlinburgu w Tennessee, Blobel przedstawił krótką prezentację demonstrującą propozycję istnienia sekwencji sygnałowej na końcu aminowym polipeptydu, jednak niepotwierdzoną jeszcze żadnymi badaniami [12]. Rok później w badaniach lekkich łańcuchów immunoglobulin zespół kierowany przez Timothy'ego Harrisona, niezależnie od zespołu Blobela, wykrył różnice w rzeczywistej wielkości powstałych polipeptydów w stosunku do prognozowanej na podstawie mRNA wielkości łańcuchów polipeptydowych. Autor publikacji prezentującej wyniki tego eksperymentu, Cesar Milstein, zinterpretował nadmiarową sekwencję aminokwasową jako umożliwiającą rozdzielenie białka w mikrosomach [13]. Doświadczenie to wykorzystał Blobel do aktualizacji swojej hipotezy sygnałowej. W 1974 r. George Palade w czasie swojego wykładu noblowskiego zaprezentował komórkowe mechanizmy sekrecyjne, model sygnałowy Blobela oraz kolejne etapy w zatażaniu, magazynowaniu i wydzielaniu substancji produkowanych przez komórki [14]. Po odejściu Sabatiniego w 1972 r., to właśnie Palade zainicjował kolejne badania, do których oprócz Blobela zaangażowany został Bernhard Dobberstein. Ci obaj naukowcy

w 1975 r., w oparciu o badania Milsteina, opracowali system interakcji między białkowym produktem i błoną RER, postulując indukcję transportu białek do mikrosomów i obróbki proteolitycznej peptydów sygnałowych [15]. Potwierdził to eksperyment dotyczący miejsca cięcia proteolitycznego. Blobel nie pomylił się, wskazując na mikrosomy. Lekkie łańcuchy immunoglobuliny zsyntetyzowane *in vitro* były chronione przed proteolizą wewnątrz mikrosomów, zaś powstające *in vivo* ulegały procesowi ograniczonej proteolizy poprzez obcięcie sekwencji aminokwasowej z końca aminowego do właściwego rozmiaru [16]. Inne doświadczenia pokazywały uniwersalność odkrycia sekwencji sygnałowej. Wykazano, że sekwencje sygnałowe białek wydzielniczych trzustki są hydrofobowe i przypominają sekwencję sygnałową opisaną dla lekkiego łańcucha immunoglobuliny [17].

W latach 1975-1980 zespół pracujący na Uniwersytecie Rockefellera ostatecznie udowodnił hipotezę sygnałową. Ponadto została ona rozwinięta w odniesieniu do innych białek wydzielniczych [18, 19] oraz uzupełniona o transport z cytoplazmy do chloroplastów [20] i mitochondriów [21]. Etykiety adresowe dla tych organelli różnią się od mikrosomalnych, ale uniwersalne dla wskazanych kompartmentów komórkowych [22]. Na osobne podkreślenie zasługuje odkrycie cząstki rozpoznającej sygnał (SRP, ang. *Signal Recognition Particle*) [23-25], jej receptora [26, 27] oraz peptydazy sygnałowej – enzymu, który doprowa-



**Ryc. 1.** Autoradiogram po elektroforezie SDS-PAGE pokazujący przebieg badania *in vivo* translacji, ilustrujący relacje między ilością peptydów z sekwencją sygnałową i bez niej. Próbką A była kontrolą, która obejmowała wyekstrahowane prekursory lekkiego łańcucha immunoglobulin o wyższej masie. Prążek zaznaczony w studzience S zawierał znakowane łańcuchy wyizolowane z komórek szpiczaka. W kolejnym etapie doświadczenia translacja była hamowana po upływie odpowiedniego czasu za pomocą detergentów. Zauważono, że pierwsze produkty ulegały obróbce w dojrzałe łańcuchy, gdyż rybosomy były przyłączone do błon mikrosomów, co umożliwiało odcięcie sekwencji sygnałowych. Po pewnym czasie zaczęły powstawać produkty prekursorowe zaopatrzone w sygnał kierujący białko do mikrosomów, co było wynikiem zatrzymania translacji i izolacji polipeptydów oddzielonych od błony mikrosomalnej [15] (zmodyfikowano).

dza do odcięcia SRP po wejściu białka do światła ER [28]. Wszystkie te doświadczenia zostały podsumowane

w artykule opublikowanym w 1980 r. przez Güntera Blobela, który swoją hipotezę sygnałową uogólnił do hipotezy topogenezy białek [29]. Opisywała ona zasady rządzące mechanizmem kierowania białek do odpowiednich kompartmentów w obrębie komórki. W strukturze każdego białka zawarta jest informacja określająca dokładnie, w jakim miejscu w komórce powinno się ono znajdować. Specjalne sekwencje aminokwasów decydują o tym, czy białko przedostanie się przez błonę do określonej organelli, zostanie częścią samej błony, czy też zostanie wydzielone poza komórkę. W 1984 r. odkryto pierwszą sekwencję kierującą białka do jądra (NLS, ang. *Nuclear Localization Sequence*) wraz z kompleksem poru jądrowego, importynami (karioferynami) i mechanizmem Ran-GTP [30]. Rok 1989 przyniósł doniesienia na temat sekwencji sygnałowej kierującej białko do peroksysomów [31]. W latach 90. prowadzone były liczne badania strukturalne, zwieńczone w 1997 r. poznaniem budowy kompleksu białka syntetyzowanego na rybosomie i receptora SRP kanału translokonu zbudowanego z Sec61 $\alpha$  przy współudziale Sec61 $\beta$  i Sec61 $\gamma$  [32]. W 1999 r. Günter Blobel został uhonorowany Nagrodą Nobla w dziedzinie medycyny i fizjologii właśnie za odkrycie, że - jak napisano w uzasadnieniu "białka zawierają wbudowane sygnały, które sterują ich transportem i położeniem w obrębie komórki" [33]. W wykładzie noblowskim badacz opowiadał o pracy swego życia. Przedstawił również perspektywy rozwoju biologii komórki oraz molekularnych

badania transportu wewnątrzkomórkowego [34]. W 2000 r. Blobel otrzymał tytuł doktora honoris causa Uniwersytetu Karola w Pradze.

## Perspektywy

Wraz z wiekiem kondycja naszej skóry ulega pogorszeniu. Stan ten spowodowany jest zmniejszeniem ilości naturalnych peptydów i czynników wzrostu organizmów. Są to swoiste substancje modulujące odpowiedzialne za kontrolowanie procesów naprawczych i metabolicznych, których osłabienie prowadzi do starzenia się organizmu. Substancjami o przełomowym znaczeniu w dziedzinie kosmetologii stały się peptydy biomimetyczne, których działanie opiera się na naśladowaniu naturalnych substancji sterujących procesami metabolicznymi oddziałującymi na komórki docelowe. We współczesnej medycynie estetycznej znanych jest ponad 300 peptydów biomimetycznych, a wiele nowych znajduje się na etapie badań. Sekwencje sygnałowe mają duży wpływ na oddziaływanie peptydów, które są zdolne do zapoczątkowywania procesów wewnątrzkomórkowych. W znacznym stopniu wpływają m.in. na wzrost fibroblastów oraz syntezę kolagenu i elastyny. Doprowadzenie peptydów sygnałowych do warstwy skóry właściwej inicjuje sygnał do wytworzenia makromolekuł kolagenu, a w konsekwencji do polepszenia stanu skóry [35].

Sekwencja sygnałowa może wpływać na proces przenoszenia polipeptydu

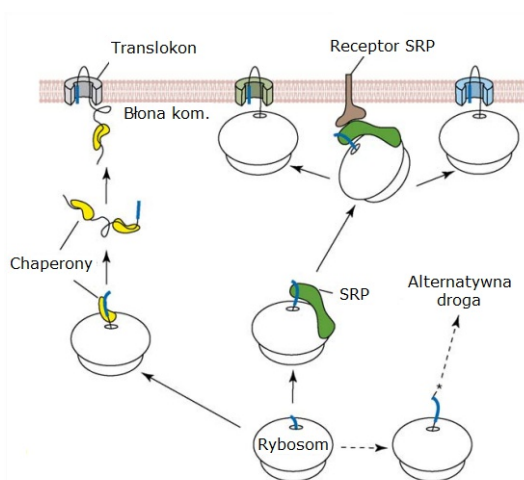
przez błonę, wykazując wrażliwość na inhibitor drobnocząsteczkowy oraz determinując zależność od chaperonów cząsteczkowych BiP. Zaproponowano model, zgodnie z którym prekursor białka wydzielniczego niewiążące cząstek rozpoznających sygnał, ponieważ są np. zbyt krótkie, dostarczane są do błony ER za pomocą odrębnego szlaku, który zależy od Sec62 i Sec63. Chociaż specyficzna sekwencja sygnałowa dostarczająca prekursor do błony ER nie wpływa na wymagania odnośnie Sec62 i Sec63, region ten może wpływać na transport z udziałem kanału Sec61 i znaczenie BIP w translokacji przez błonę. Podsumowując, sekwencja sygnałowa może regulować specyficzne aspekty translokacji przez kanał Sec61 na etapie następującym po zależnym od Sec62/Sec63 dostarczeniu peptydów do ER [36].

Typowy rozmiar sekwencji sygnałowej to około 20-30 reszt aminokwasowych, wśród których rozpoznawalne są trzy domeny strukturalne (podstawowa „N domena”, powstała z 7-13 reszt hydrofobowych „domena H” i lekko polarna „domena C”). Postuluje się, że sekwencje sygnałowe są często łatwo wymienne i tolerancyjne wobec szerokiego zakresu mutacji. Wykazano, że 20% losowych sekwencji może promować wydzielanie inwertazy w drożdżach [37]. Gdy substrat jest kierowany do ER lub błony cytoplazmatycznej, sekwencja sygnałowa powinna oddziaływać wzajemnie z translokonem. Mimo, że translokony mogą znacznie różnić się u różnych organizmów, a nawet w obrębie jednej



komórki, większość sekwencji sygnałowych wchodzi w interakcję z konserwatywnym, heteromerycznym kompleksem Sec61p lub SecY. Najnowsze badania ujawniły wiele wyjątków od powszechnie panującego poglądu mówiącego, że sekwencje sygnałowe są proste, zdegenerowane i wymienne. Na podstawie obecnego stanu wiedzy możemy sądzić, że zarówno sekwencje sygnałowe jak i różnorodność kompleksów translokonu może odgrywać ważną rolę w modulowaniu biogenezy białka [38].

Wydzielnicze białka są zwykle transportowane przez retikulum endoplazmatyczne do aparatu Golgiego, a następnie do błony komórkowej, gdzie są uwalniane do przestrzeni pozakomórkowej. Jednakże wiele z nich również osiąga te cele za pomocą innych dróg. Niekonwencjonalne wydzielanie białka (UPS, ang. *Unconventional protein secretion*) jest złożonym procesem i dotyczy "ładunków" bez peptydu sygnałowego lub domeny transbłonowej, które mogą ulegać translokacji przez błonę komórkową i takich, które przenikają przez błonę komórkową, pomijając aparat Golgiego, pomimo wprowadzania do mikrosomów ER. Wydzielanie białka (UPS) jest w dużej mierze wywołane przez stres komórkowy, stan zapalny, stres wywołany niedoborem składników pokarmowych lub naprężenia mechaniczne. Białka transbłonowe point mutant mogą ominąć aparat Golgiego. Przeszkody dla UPS (CUPSs, ang. *Compartments for UPS*) nie powodują wytworzenia autofagosomów, a stano-



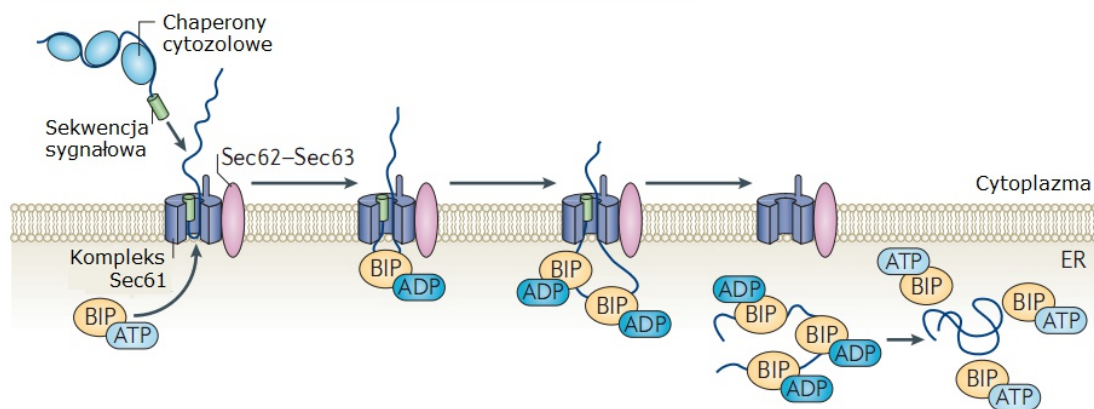
**Ryc. 2.** Sekwencje sygnałowe określają wybór drogi białka. Polipeptyd (czarna wstążka), zawierający sekwencję sygnałową (niebieski), który wyłania się z rybosomu, może współdziałać z SRP (zielony), który jest wychwytywany przez błonowy receptor SRP, a następnie sekwencja sygnałowa oddziałuje z translokonem. Inną drogą jest związanie polipeptydu z chaperonami (żółte), które transportują sekwencję sygnałową bezpośrednio po sfałdowaniu białka do translokonu. Rozpoznanie przez SRP jest zazwyczaj decydującym zdarzeniem: białka, których sygnałowe sekwencje nie są rozpoznawane przez SRP, są utrzymywane w luźno złożonej konformacji przez białka opiekuńcze i kierowane do ER lub innych wewnątrzkomórkowych miejsc docelowych (w przypadku, gdy rozpoznanie SRP jest blokowane przez modyfikację sekwencji sygnałowej). Po dotarciu białka do błony, sekwencje sygnałowe mogą również wpływać na ich dostawę do różnych translokonów. Jeśli białko oznaczone sekwencją sygnałową zostanie wytworzone w cytoplazmie, może przejść modyfikację enzymatyczną i pełnić swoją funkcję [39] (zmodyfikowano).

wią mechanizm prowadzący do zwiększenia stężenia Acb1 przed jego wydzielaniem. Stres ER i aparatu Golgiego powoduje przebudowę fałdowania białka GRASP55, jego fosforylację i wniknięcie do ER, w których pośredniczy w obejściu aparatu Golgiego przez pewne ładunki, podczas gdy przejście pozostałych zależy od stężenia czynników HSP70/DNAJ14. Specyficzne rzęskowe białka również mogą ominąć aparat Golgiego. UPS zaobserwowano u wszystkich organizmów zbadanych pod tym względem do tej pory [40].

Wszystkie sekwencje sygnałowe zawierają hydrofobowy region rdzeniowy, ale niezależnie od tego wykazują duże różnice w całkowitej długości i sekwencji aminokwasowej. Wykaza-

no, że to zróżnicowanie pozwala sekwencjom sygnałowym na określenie różnych sposobów kierowania i umieszczania w błonie, a nawet na wykonywanie funkcji po odcięciu od macierzystego białka [41].

Peptydy sygnałowe odgrywają kluczową rolę podczas przenoszenia białek wydzielniczych przez błonę zarówno u prokariotów i eukariotów. Przy przechodzeniu przez błonę sekwencja sygnałowa zostaje odcięta przez peptydazę sygnałową. W peryplazmie znajduje się osobny zestaw białek opiekuńczych ułatwiających poprawne fałdowanie oraz białka odpowiedzialne za powstawanie wiązań disiarczkowych. U *E. coli* występują sekwencje sygnałowe, które są związane z błoną peryplazmatycznie, wewnątrz i ze-



**Ryc. 3.** Obecna postać hipotezy sygnałowej. Polipeptydy z sekwencją sygnałową, otoczone przez białka opiekuńcze, przyłączają się do poru translokonu i po zadziałaniu kompleksu Sec62/Sec63 są wciągane do wnętrza ER. Tam chaperony BIP wiążą się do polipeptydu przy pomocy energii powstałej w wyniku hydrolizy ATP. Następuje wejście całego białka do wnętrza ER i odcięcie sekwencji sygnałowej przez peptydazę sygnałową. Chaperony BIP mają większe powinowactwo do ATP, więc po fosforylacji i powstaniu bardziej energetycznej postaci adenosynofosforanu, są wraz z nią odłączane od polipeptydu. Powstałe białko ulega fałdowaniu do postaci dojrzałej i może ulec sekrecji lub pełnić specyficzne funkcje [43] (zmodyfikowany).

wnętrze oraz są wydzielane na zewnątrz komórki [42].

## Podsumowanie

Sekwencje sygnałowe stanowią etykiety kierujące polipeptydy do odpowiednich kompartmentów komórkowych. Odkryto charakterystyczne ciągi aminokwasowe oraz mechanizmy działania adresowania białek dla większości organelli. Obecne analizy odwołują się do bogatej historii badań transportu

białek, jednak stanowią jednocześnie podstawę praktycznego wykorzystania tej wiedzy. Hipoteza sygnałowa leży u źródeł powstania specyficznie kierowanych środków leczniczych. Pozwala także na dokładniejsze badania metabolizmu komórkowego i odpowiedzi na stresory. Dzięki zaawansowanym technikom badawczym jesteśmy w stanie obrazować stężenie substancji *in vivo*, co pozwala nam na przewidywania dotyczące zmian w homeostazie organizmu.

## Bibliografia:

[1] Nobel Lectures, Physiology or Medicine 1971-1980, Lindsten J., World Scientific Publishing Co., Singapore, 1992.  
[2] Porter K. R. i wsp., A study of tissue culture cells by electron microscopy: methods and preliminary observations, *Journal of Experimental Medicine*, 1945, 81, 233-46.  
[3] Claude A., The constitution of mitochondria and microsomes and the distribution of nucleic acids in the cytoplasm of leukemic cell, *Journal of Experimental Medicine*, 1944, 80, 19.  
[4] Claude A. i wsp., An electron microscope study of isolated mitochondria. Methods and preliminary results, *Journal of Experimental Medicine*, 1945, 81, 51.  
[5] de Duve C. i wsp., Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue, *Biochemical Journal*, 1955, 60(4), 604-17.  
[6] de Duve C. i wsp., Peroxisomes (microbodies and related particles), *Physiological reviews*, 1966, 46(2), 323-57.  
[7] Palade G. E., Studies on the endoplasmic reticulum. II. Simple dispositions in cells in situ, *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, 1955, 1, 567-82.  
[8] Palade G. E., A small particulate component of the cytoplasm, *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, 1955, 1, 59-68.  
[9] Siekevitz, P. i wsp., A cytochemical study on

the pancreas of the guinea pig. V. In vivo incorporation of leucine-1-C14 into the chymotrypsinogen of various cell fractions, *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, 1960, 7, 619-30.  
[10] Redman C. i wsp., Vectorial discharge of peptides released by puromycin from attached ribosomes, *PNAS*, 1966, 56, 608-15  
[11] Sabatini D. i wsp., On the attachment of ribosomes to microsomal membranes, *Journal of Molecular Biology*, 1966, 19, 503-24.  
[12] Blobel G. i wsp., Ribosome-membrane interactions in eukaryotic cells, *Biomembranes*, 1971, 2, 193-5.  
[13] Milstein C. i wsp., A possible precursor of immunoglobulin light chains, *Nature New Biology*, 1972, 239, 117-20.  
[14] Palade G. E., Intracellular Aspects of the Process of Protein Secretion, Nobel Lectures, Physiology or Medicine 1971-1980, Lindsten J., World Scientific Publishing Co., Singapore, 1992.  
[15] Blobel G. i wsp., Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma, *Journal of Cell Biology*, 1975, 67, 835-51.  
[16] Blobel G. i wsp., Transfer of protein across membranes. II. Reconstitution of functional

rough microsomes from heterologous components, *Journal of Cell Biology*, 1975, 67, 852-62.

[17] Devillers-Thiery A. i wsp., Homology in amino-terminal sequence of precursors to pancreatic secretory proteins, *PNAS*, 1975, 72, 5016-20.

[18] Lingappa V. R. i wsp., Nascent prehormones are intermediates in the biosynthesis of authentic bovine pituitary growth hormone and prolactin, *PNAS*, 1977, 74, 2432-6.

[19] Shields D. i wsp., Cell-free synthesis of fish preproinsulin, and processing by heterologous mammalian microsomal membranes, *PNAS*, 1977, 74, 2059-63.

[20] Dobberstein B. i wsp., In vitro synthesis and processing of a putative precursor for the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase of *Chlamydomonas reinhardtii*, *PNAS*, 1977, 74, 1082-5.

[21] Maccacchini M. L. i wsp., Import of proteins into mitochondria: precursor forms of the extramitochondrially made F1-ATPase subunits in yeast, *PNAS*, 1979, 76, 343-7.

[22] Schatz, G. i wsp., Common principles of protein translocation across membranes, *Science*, 1996, 271, 1519-26.

[23] Walter P. i wsp., Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum. I. Signal recognition protein (SRP) binds to in vitro-assembled polysomes synthesizing secretory protein, *Journal of Cell Biology*, 1981, 91, 545-50.

[24] Walter P. i wsp., Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum. II. Signal recognition protein (SRP) mediates the selective binding to microsomal membranes of in-vitro-assembled polysomes synthesizing secretory protein, *Journal of Cell Biology*, 1981, 91, 551-6.

[25] Walter P. i wsp., Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum III. Signal recognition protein (SRP) causes signal sequence-dependent and site-specific arrest of chain elongation that is released by microsomal membranes, *Journal of Cell Biology*, 1981, 91, 557-61.

[26] Gilmore R. i wsp., Protein translocation across the endoplasmic reticulum. I. Detection

in the microsomal membrane of a receptor for the signal recognition particle, *Journal of Cell Biology*, 1982, 95, 463-9.

[27] Gilmore R. i wsp., Protein translocation across the endoplasmic reticulum. II. Isolation and characterization of the signal recognition particle receptor, *Journal of Cell Biology*, 1982, 95, 470-7.

[28] Evans E. A. i wsp., Purification of microsomal signal peptidase as a complex, *PNAS*, 1986, 83, 5815.

[29] Blobel G., Intracellular protein topogenesis, *PNAS*, 1980, 77, 1496-500.

[30] Kalderon D. i wsp., A short amino acid sequence able to specify nuclear location, *Cell*, 1984 39, 499-509.

[31] Gould S. J. i wsp., A conserved tripeptide sorts proteins to peroxisomes, *Journal of Cell Biology*, 1989, 108, 1657-64.

[32] Beckmann R. i wsp., Alignment of conduits for the nascent polypeptide chain in the ribosome-Sec61 complex, *Science*, 1997 278, 2123-6.

[33] A Nobel Prize for cell biology, *Nature Cell Biology*, 1999, 1, E169.

[34] Blobel G., Protein targeting, Nobel Lectures, Physiology or Medicine 1996-2000, Hans Jörnvall, World Scientific Publishing Co., Singapore, 2003.

[35] Kępa A., Peptydy biomimetyczne i czynniki wzrostu w kosmologii i medycynie estetycznej, *Kosmetologia Estetyczna*, 2013, 2(2), 105-11.

[36] Johnson N. i wsp., The signal sequence influences post-translational ER translocation at distinct stages, *PLoS ONE*, 2013, 8(10), e75394.

[37] Ngsee J. K. i wsp., Cassette mutagenic analysis of the yeast invertase signal peptide: effects on protein translocation, *Molecular and Cellular Biology*, 1989, 9(8), 3400-10.

[38] Voss M. i wsp., Mechanism, specificity, and physiology of signal peptide peptidase (SPP) and SPP-like proteases, *Biochimica et Biophysica Acta*, 2013, 1828(12), 2828-39.

[39] Hegde R. S. i wsp., The surprising complexity of signal sequences, *Trends in Biochemical Sciences*, 2006, 31(10), 563-71.

[40] Rabouille C., Pathways of unconventional protein secretion, *Trends in Cell Biology*, 2016,

DOI: 10.1016/j.tcb.2016.11.007.

[41] Martoglio B. i wsp., Signal sequences: more than just greasy peptides, Trends in Cell Biology, 1998, 8(10), 410-5.

[42] Singh P. i wsp., Effect of signal peptide on stability and folding of Escherichia coli

thioredoxin, PLoS One, 2013, 8(5), e63442.

[43] Rapoport T. A., Protein translocation across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial plasma membrane, Nature, 2007, 450, 663-9.

# Post-transkrypcyjne modyfikacje RNA

Kinga Pajdzik<sup>1</sup>, Martyna Wasilewska<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Zakład Biochemii Ogólnej, Koło Naukowe Studentów Biotechnologii „Mygen”

<sup>2</sup> Zakład Biochemii i Fizjologii Roślin

Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii

Uniwersytet Jagielloński w Krakowie

kinga.pajdzik@gmail.com

Praca napisana pod opieką prof. dr hab. Jolanty Jury

**Pierwsze doniesienia na temat modyfikacji RNA sięgają lat 60-tych ubiegłego wieku, jednakże mimo upływu czasu, temat ten pozostaje w wielu kwestiach enigmatyczny i wymaga bardziej szczegółowych badań. Dotychczas uzyskane wyniki pokazują, że modyfikacje RNA są zjawiskiem powszechnie występującym, obserwowanym w komórkach organizmów prokariotycznych i eukariotycznych. Modyfikacje te dotyczą zarówno kodującego jak i niekodującego RNA. Kwas rybonukleinowy może być poddawany ponad stu różnym modyfikacjom chemicznym, z czego N<sup>6</sup>-metyloadenozyna (m<sup>6</sup>A) określana jest jako najbardziej powszechna modyfikacja występująca w eukariotycznym mRNA. Metylacja RNA jest procesem odwracalnym. Wpływa m.in. na szybkość eksportu transkryptu z jądra do cytoplazmy i decyduje o jego dalszych losach poprzez promowanie translacji lub rozpadu. Odgrywa również ważną rolę w takich procesach jak różnicowanie komórek czy rozwój embrionalny. Inne modyfikacje mRNA obejmują N<sup>1</sup>-metyloadenozynę (m<sup>1</sup>A), 5-metylocytozynę (m<sup>5</sup>C) i pseudourydynę (Ψ), które wspólnie z m<sup>6</sup>A odpowiadają za powstawanie epitranskryptomu i kodują nowy poziom informacji kontrolujących syntezę białka. W niniejszej pracy przedstawione zostaną doniesienia z przeprowadzonych w ostatnim czasie badań związanych z modyfikacjami mRNA, w szczególności z m<sup>6</sup>A.**

## Wprowadzenie

Od momentu odkrycia pierwszych posttranskrypcyjnych modyfikacji RNA zidentyfikowano ponad 100 różnych modyfikacji chemicznych tych cząsteczek. Występują one u wszystkich organizmów [1], a także u wirusów [2]. Wyniki wielu badań wskazują na obecność modyfikacji w mRNA [3–5], a także w niekodującym RNA, m.in. w rRNA [6], tRNA [7], miRNA [8, 9], czy

lncRNA [9]. Dynamiczny rozwój technik badawczych umożliwił w ostatnim czasie pozyskanie nowych informacji i poznanie niektórych mechanizmów związanych z modyfikacjami RNA. Za najbardziej powszechnie występującą modyfikację uznaje się metylację azotu w pozycji N<sup>6</sup> pierścienia purynowego adeniny (m<sup>6</sup>A) [10]. Modyfikacja ta jest wysoce konserwatywna i występuje za-



również u roślin [11], ssaków [12], archeonów [13], drożdży [14], bakterii [15], a nawet u wirusów [2]. Zbadano, że u ssaków modyfikacja m<sup>6</sup>A dotyczy ponad 7600 mRNA i ponad 300 niekodujących RNA. Jest obserwowana w obrębie długich egzonów, blisko kodonu STOP, jak i w 3'UTR, jednakże nie wykazano jej obecności w ogonie poli(A) [16, 17]. Badania wskazują na konserwatywny motyw RRM6ACH [17]. Występowanie m<sup>6</sup>A jest szeroko rozpowszechnione w różnych tkankach, z czego najwyższy poziom zaobserwowano w mózgu, wątrobie i nerkach. Te same badania pokazują, iż w czasie rozwoju osobniczego poziom m<sup>6</sup>A wzrasta [16].

### **Białka biorące udział w metylacji adeniny**

Metylację reszt adeniny w mRNA przeprowadza wieloskładnikowy kompleks, złożony m.in. z heterodimeru METTL3 – METTL14, z czego aktywność katalityczną metylotransferazy posiada METTL3 [18]. Donorem grupy metylowej jest S-adenozylometionina. Zidentyfikowano kolejne składniki kompleksu: czynniki biorące udział w składaniu RNA, WTAP oraz KIAA1429 są niezbędne do efektywnej metylacji u ssaków [19, 20]. Wykazano, że metylacja adeniny w mRNA jest procesem dynamicznym i odwracalnym. Pierwszą zidentyfikowaną demetylazą m<sup>6</sup>A było białko FTO [21]. FTO związane jest z otyłością [22], co sugeruje, że modyfikacje RNA mają znaczenie w stanach patologicznych. Kolejną poznaną demetylazą była ALKBH5 [23]. Metylasy i demetylasy warunkują

występowanie i lokalizację m<sup>6</sup>A, podczas gdy zidentyfikowane białka oddziałujące z metylowanym mRNA pośredniczą w pełnieniu funkcji zależnych od m<sup>6</sup>A. Wśród tych białek wyróżnia się rodzinę YTH (YTHDF1, YTHDF2, YTHDF3 i YTHDC1) [17]. Białka z tej rodziny posiadają konserwatywną kieszeń wiążącą m<sup>6</sup>A [24]. YTHDF2 oddziałuje z ponad 3000 matryc RNA, kodujących i niekodujących, lecz w większości to mRNA. Po związaniu RNA z YTHDF2 kierowane jest ono do miejsc degradacji w komórce [25]. Kolejnymi białkami oddziałującymi z mRNA zawierającymi m<sup>6</sup>A są heterogenne jądrowe rybonukleoproteiny, takie jak HNRNPA2B1 oraz HNRNPC. HNRNPC rozpoznaje zmiany w strukturze drugorzędowej mRNA indukowane m<sup>6</sup>A, natomiast mechanizm selektywnego wiązania m<sup>6</sup>A przez HNRNPA2B1 nie jest jeszcze poznany [26].

### **m<sup>6</sup>A reguluje metabolizm mRNA**

#### m<sup>6</sup>A zmienia strukturę RNA

Modyfikacja m<sup>6</sup>A w przypadku dwuniciowych struktur RNA nie zmienia parowania Watson-Crick A-U, ale powoduje osłabienie duplexu RNA [27]. Natomiast w przypadku jednoniciowych fragmentów RNA, m<sup>6</sup>A wzmacnia oddziaływanie warstwowe, w związku z czym, metylowane rejony wykazują tendencję do przyjmowania jednoniciowej struktury [28]. Ostatnie badania pokazują, iż m<sup>6</sup>A w rejonach kodujących może prowadzić do sterycznych ograniczeń uniemożliwiających oddziaływanie kodon-anty kodon, co wpływa na dynamikę translacji [7].

### m<sup>6</sup>A wpływa na dojrzewanie mRNA

Badania pokazują, iż wiele miejsc poddawanych metylacji N<sup>6</sup>-adenozyny znajduje się w pre-mRNA, w intronach [29]. Zaobserwowano, iż metylazy i demetylazy zlokalizowane są w jądrze komórkowym, w interchromatynie, gdzie ma miejsce alternatywne składanie i przechowywanie mRNA [23, 30, 31]. Demetylaza FTO wpływa na powstawanie dojrzałego transkryptu poprzez zapobieganie wiązaniu do pre-mRNA białka SRSF2, które jest bogate w serynę oraz argininę i pełni rolę czynnika zaangażowanego w składanie RNA SRSF2 [32]. Białka oddziałujące z m<sup>6</sup>A również wpływają na alternatywne składanie. YTHDC1 rekrutuje białko SRSF3, które jest czynnikiem składania RNA, blokując wiązanie czynnika SRSF10, co prowadzi do łączenia egzonów [33]. Przytoczone doniesienia wskazują, iż modyfikacje m<sup>6</sup>A są ściśle powiązane z wczesną obróbką mRNA.

### m<sup>6</sup>A a eksport mRNA z jądra do cytoplazmy

Eksport mRNA z jądra do cytoplazmy jest kluczowym procesem łączącym transkrypcję i obróbkę w jądrze z translacją w cytoplazmie i wpływa na regulację ekspresji genów. Przeprowadzone badania wskazują na wpływ m<sup>6</sup>A na ten proces. Wyciszenie METTL3 hamuje transport mRNA z jądra [34], podczas gdy wyciszenie ALKBH5 daje odwrotny efekt [23]. To sugeruje, iż m<sup>6</sup>A jest niezbędne dla eksportu transkryptów do cytoplazmy, lecz dokładne mechanizmy tej regulacji nie są jeszcze poznane.

### Wpływ m<sup>6</sup>A na translację

m<sup>6</sup>A reguluje translację poprzez kilka mechanizmów. YTHDF1 selektywnie rozpoznaje modyfikacje m<sup>6</sup>A w mRNA i wpływa na przyłączenie rybosomu. Dodatkowo, YTHDF1 oddziałuje z czynnikiem inicjującym eIF3 umożliwiając inicjację translacji [10]. Ostatnie badania wskazują, iż METTL3 odpowiada nie tylko za metylację N<sup>6</sup>-adenozyny, ale również reguluje translację. Wyciszenie METTL3 prowadzi do obniżenia ekspresji białka bez zmiany ilości mRNA i METTL3 promuje translację poprzez rekrutację czynnika inicjującego eIF3. Zaobserwowane efekty były niezależnie od aktywności katalitycznej METTL3 [35]. Kolejne badania wskazują, że obecność m<sup>6</sup>A w obrębie regionu 5'UTR wpływa pozytywnie na translację, w sposób niezależny od czapeczki [36, 37].

### m<sup>6</sup>A kieruje mRNA do degradacji

Finalnym etapem metabolizmu mRNA jest jego rozkład, podczas którego mRNA ulega destabilizacji i degradacji. Wykazano wpływ m<sup>6</sup>A na stabilność mRNA. Pierwszym dowodem na rozkład mRNA zależny od m<sup>6</sup>A były badania dotyczące białka YTHDF2 [25]. Białko to posiada 2 domeny: C-kończową, która selektywnie wiąże metylowane transkrypty oraz N-kończową odpowiadającą za dostarczenie związanych transkryptów do miejsc degradacji w komórce. Wyciszenie genu kodującego YTHDF2 powoduje wzrost stabilności mRNA poprzez wydłużenie czasu rozkładu, co wskazuje na rolę m<sup>6</sup>A w kierowaniu metylowanych transkryptów na drogę degradacji. Wykazano, iż YTHDF2 oddziałuje

z podjednostką CNOT1 kompleksu CCR4-NOT, umożliwiając złożenie tego kompleksu i degradację łańcucha poli(A) [25].

## **Regulacja funkcji komórek przez m<sup>6</sup>A**

### Funkcje m<sup>6</sup>A w regulacji rytmu okołodobowego

Badania nad rytmem okołodobowym ssaków były jednymi z pierwszych, które wykazały wpływ m<sup>6</sup>A na funkcjonowanie komórki. Proces ten opiera się na mechanizmach ujemnego sprzężenia zwrotnego w ekspresji genów. Białka związane z utrzymaniem cyklu okołodobowego, takie jak PER2 i ARNTL, regulują swoją własną transkrypcję. Badania wykazały, iż zahamowanie metylacji N<sup>6</sup>-adenozyny w transkryptach wspomnianych białek prowadzi do retencji mRNA w jądrze, co w efekcie prowadzi do wydłużenia cyklu okołodobowego [34].

### Funkcje m<sup>6</sup>A w różnicowaniu komórek

Kolejnym dowodem wpływu metylacji adenin w RNA na procesy komórkowe są badania, w których wykazano, że tego typu modyfikacje wpływają na różnicowanie preadipocytów w czasie adipogenezy. FTO kontroluje poziom m<sup>6</sup>A, co wpływa na wiązanie czynnika składania RNA SRSF2, a tym samym na alternatywne formy wielu kluczowych transkryptów związanych z adipogenezą [32]. Inne badania donoszą, iż demetylaza ALKBH5 wpływa na różnicowanie nowotworowych komórek macierzystych raka piersi BCSC. W warunkach hipoksji następuje demetylacja transkryptu kluczowego

czynnika pluripotencjalności NANOG przez ALKBH5, co prowadzi do wzrostu stabilności jego transkryptu i promuje proliferację komórek BCSC [38].

## **Inne modyfikacje RNA**

### Modyfikacja azotu w pozycji N1 pierścienia purynowego adeniny (m<sup>1</sup>A)

Obecność m<sup>1</sup>A odkryto w RNA kilka dekad temu [39]. Modyfikacja ta jest związana z regulacją struktury i stabilności tRNA i rRNA, ale ostatnie badania wskazują na jej obecność również w eukariotycznym mRNA [40, 41]. Modyfikacja m<sup>1</sup>A występuje w ponad 7000 miejsc w obrębie kodującego i niekodującego RNA [40] i zidentyfikowano około 800 m<sup>1</sup>A w sześciuset ludzkich genach [41]. Wykazano, że modyfikacja m<sup>1</sup>A jest zlokalizowana w wysoce ustrukturyzowanych regionach, blisko kodonu START i poziom m<sup>1</sup>A koreluje pozytywnie z wydajnością translacji i poziomem białka. Ten rodzaj modyfikacji występuje w wielu typach komórek ssaków, a także u drożdży [40]. Pozytywny ładunek w obrębie nukleotydu, który niesie ze sobą ta modyfikacja, wskazuje na możliwość zmiany oddziaływania białko-RNA. Badania pokazują, iż m<sup>1</sup>A zaburza parowanie zasad i indukuje topnienie lokalnych dupleksów RNA [42]. Wykazano również, że modyfikacja m<sup>1</sup>A jest odwracalna [41], co sugeruje, że może być związana z regulacją różnych procesów.

### Metylacja RNA w pozycji 5 pierścienia cytozyny (m<sup>5</sup>C)

m<sup>5</sup>C występuje w mRNA w mniejszym stopniu niż m<sup>6</sup>A [43]. W organizmach

eukariotycznych zidentyfikowano metylotransferazy odpowiadające za metylację tRNA, m.in. białko Dnmt2. Kolejna metylotransferaza NSUN2 odpowiada za metylację cytozyny nie tylko w tRNA, ale również w mRNA i wielu niekodujących RNA. Biologiczna rola m<sup>5</sup>C nie została jak do tej pory poznana, ale w związku z jej pochodnymi – 5-hydroksymetylocytozyną i 5-formylocytozyną obserwowanymi w RNA eukariontów sugeruje się, że może ona pełnić funkcje regulacyjne.

### Pseudourydyna (Ψ)

Szeroko rozpowszechnioną modyfikacją RNA jest pseudourydyna (Ψ). Największa jej ilość występuje w tRNA i rRNA, gdzie wzmacnia ich funkcje poprzez stabilizację struktury [44]. Początkowo nie stwierdzono obecności pseudourydyny w mRNA, jednakże prowadzone w ostatnim czasie badania polegające na sztucznym wprowadzeniu tej modyfikacji do mRNA i obserwacji dalszych fizjologicznych następstw oraz metoda „*single-nucleotide resolution*”, która pozwala na selektywne wyznaczenie miejsc pseudourydynylacji [44], doprowadziły do odkrycia takich miejsc w mRNA u drożdży [45] i ssaków [46]. Zdolność pseudourydyny do zmiany parowania zasad wpływa nie tylko na strukturę RNA, ale również na kodowanie w mRNA, co podkreśla potencjalną rolę Ψ jako elementu regulatorowego [47].

### Modyfikacja rybozy w łańcuchu RNA

Metylacja grupy 2'-hydroksylowej rybozy – 2'-O-metylacja (2'OMe) jest powszechną modyfikacją RNA. Została

zidentyfikowana w większości eukariotycznych klas RNA [48], a jej obecność w ludzkim mRNA odkryto w tym samym czasie co m<sup>6</sup>A [49]. Za proces metylacji rRNA odpowiedzialne są małe jądrowe RNA (snoRNA) [50]. Ostatnie badania wykazują, iż docelowymi cząsteczkami snoRNA mogą być także mRNA. Istnieje wiele metod służących wykrywaniu miejsc 2'OMe [51], jednak dokładna detekcja miejsc metylacji i ich funkcje, jakie mogą pełnić w mRNA, wymagają więcej czasu i bardziej zaawansowanych technik badawczych.

## **Podsumowanie**

Modyfikacje RNA cechuje powszechność występowania w naturze. Jak do tej pory, najlepiej scharakteryzowano modyfikację m<sup>6</sup>A. m<sup>6</sup>A wykazuje unikalne wzory występowania w obrębie transkryptów. Odwracalność i dynamika m<sup>6</sup>A jest możliwa dzięki działaniu metylaz i demetylaz, a sama modyfikacja jest rozpoznawana przez specjalnie białka oddziałujące z metylowanymi sekwencjami RNA. Szacuje się, że ponad 7000 ludzkich genów zawiera miejsca m<sup>6</sup>A (motyw RRm6ACH), co wskazuje na istotną rolę tej modyfikacji jako elementu regulatorowego, a potwierdzają to wyniki wielu badań. Metylacja m<sup>6</sup>A wpływa na strukturę RNA, kontroluje takie procesy jak dojrzewanie mRNA, eksport transkryptów z jądra do cytoplazmy, rozkład mRNA. Dodatkowo m<sup>6</sup>A odgrywa istotną rolę m.in. w utrzymaniu cyklu ośrodkowego komórki czy jej różnicowaniu. Możliwości modyfikacji chemicznych RNA są bardzo szerokie i uważa się, że

jest ponad sto różnych możliwości. Poza m<sup>6</sup>A, zidentyfikowano w mRNA modyfikacje w innych pozycjach adeniny, np. modyfikację m<sup>1</sup>A, oraz modyfikację cytozyny, wprowadzenie pseudouridy-

ny czy modyfikacje rybozy (m<sup>5</sup>C, Ψ oraz 2'OMe). Są one jednak słabo scharakteryzowane i wymagane są dalsze badania celem poznania mechanizmów i funkcji tych modyfikacji.

## Bibliografia:

- [1] Machnicka M. A. i wsp., MODOMICS: A database of RNA modification pathways - 2013 update, *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(D1), 1-6.
- [2] Beemon K. i wsp., Localization of N<sup>6</sup>-methyladenosine in the Rous sarcoma virus genome, *J Mol Biol*, 1977, 113(1), 165-79.
- [3] Perry R. P. i wsp., Existence of methylated messenger RNA in mouse L cells, *Cell*, 1974, 1(1), 37-42.
- [4] Lavi S. i wsp., Methylated simian virus 40-specific RNA from nuclei and cytoplasm of infected BSC-1 cells, *PNAS*, 1975, 72(6), 2012-6.
- [5] Furuichi Y. i wsp., Methylated, blocked 5 termini in HeLa cell mRNA, *PNAS*, 1975, 72(5), 1904-8.
- [6] Iwanami Y. i wsp., Methylated bases of ribosomal ribonucleic acid from HeLa cells, *Arch Biochem Biophys*, 1968, 126(1), 8-15.
- [7] Choi J. i wsp., N(6)-methyladenosine in mRNA disrupts tRNA selection and translation-elongation dynamics, *Nat Struct Mol Biol*, 2016, 23(2), 110-5.
- [8] Berulava T. i wsp., N<sup>6</sup>-adenosine methylation in miRNAs, *PLoS One*, 2015, 10(2), 1-13.
- [9] Liu N. i wsp., Probing N<sup>6</sup>-methyladenosine RNA modification status at single nucleotide resolution in mRNA and long noncoding RNA, *RNA*, 2013, 19, 1848-56.
- [10] Wang X. i wsp., N<sup>6</sup>-methyladenosine modulates messenger RNA translation efficiency, *Cell*, 2015, 161(6), 1388-99.
- [11] Zhong S. i wsp., MTA is an *Arabidopsis* messenger RNA adenosine methylase and interacts with a homolog of a sex-specific splicing factor, *Plant Cell*, 2008, 20(5), 1278-88.
- [12] Horowitz S. i wsp., Mapping of N<sup>6</sup>-methyladenosine residues in bovine prolactin mRNA, *PNAS*, 1984, 81(18), 5667-71.
- [13] Kowalak J. A. i wsp., The role of posttranscriptional modification in stabilization of transfer-RNA from hyperthermophiles, *Biochemistry*, 1994, 33(25), 7869-76.
- [14] Krug R. M. i wsp., Influenza viral mRNA contains internal N<sup>6</sup>-methyladenosine and 5'-terminal 7-methylguanosine in cap structures, *J Virol*, 1976, 20(1), 45-53.
- [15] Deng X. i wsp., Widespread occurrence of N<sup>6</sup>-methyladenosine in bacterial mRNA, *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(13), 6557-67.
- [16] Meyer K. D. i wsp., Comprehensive analysis of mRNA methylation reveals enrichment in 3' UTRs and near stop codons, *Cell*, 2012, 149(7), 1635-46.
- [17] Dominissini D. i wsp., Topology of the human and mouse m<sup>6</sup>A RNA methylomes revealed by m<sup>6</sup>A-seq, *Nature*, 2012, 485(7397), 201-6.
- [18] Wang X. i wsp., Structural basis of N<sup>6</sup>-adenosine methylation by the METTL3-METTL14 complex, *Nature*, 2016, 534(7608), 575-8.
- [19] Liu J. i wsp., A METTL3-METTL14 complex mediates mammalian nuclear RNA N<sup>6</sup>-adenosine methylation, *Nat Chem Biol*, 2014, 10(2), 93-5.
- [20] Schwartz S. i wsp., Perturbation of m<sup>6</sup>A writers reveals two distinct classes of mRNA methylation at internal and 5' sites, *Cell Rep*, 2014, 8(1), 284-96.
- [21] Jia G. i wsp., N<sup>6</sup>-methyladenosine in nuclear RNA is a major substrate of the obesity-associated FTO, *Nat Chem Biol*, 2011, 7(12), 885-7.
- [22] Frayling T. M. i wsp., A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity, *Science*, 2007, 316(5826), 889-94.
- [23] Zheng G. i wsp., ALKBH5 is a mammalian RNA demethylase that impacts RNA metabolism

- and mouse fertility, *Mol Cell*, 2013, 49(1), 18-29.
- [24] Li F. i wsp., Structure of the YTH domain of human YTHDF2 in complex with an m<sup>6</sup>A mononucleotide reveals an aromatic cage for m<sup>6</sup>A recognition, *Cell Res*, 2014, 24, 1490-2.
- [25] Wang X. i wsp., N<sup>6</sup>-methyladenosine-dependent regulation of messenger RNA stability, *Nature*, 2014, 505(7481), 117-20.
- [26] Liu N. i wsp., N(6)-methyladenosine-dependent RNA structural switches regulate RNA-protein interactions, *Nature*, 2015, 518(7540), 560-4.
- [27] Kierzek E. i wsp., The thermodynamic stability of RNA duplexes and hairpins containing N<sup>6</sup>-alkyladenosines and 2-methylthio-N<sup>6</sup>-alkyladenosines, *Nucleic Acids Res*, 2003, 31(15), 4472-80.
- [28] Roost C., Structure and thermodynamics of N<sup>6</sup>-methyladenosine in RNA: A spring-loaded base modification, *J Am Chem Soc*, 2015, 137(5), 2107-15.
- [29] Carroll S. M. i wsp., N<sup>6</sup>-methyladenosine residues in an intron-specific region of prolactin pre-mRNA, *Mol Cel. Biol*, 1990, 10(9), 4456-65.
- [30] Ping X.-L. i wsp., Mammalian WTAP is a regulatory subunit of the RNA N<sup>6</sup>-methyladenosine methyltransferase, *Cell Res*, 2014, 24(2), 177-89.
- [31] Gerken T. i wsp., The obesity-associated FTO gene encodes a 2-oxoglutarate - dependent nucleic acid demethylase, *Science*, 2007, 318(5855), 1469-72.
- [32] Zhao X. i wsp., FTO-dependent demethylation of N<sup>6</sup>-methyladenosine regulates mRNA splicing and is required for adipogenesis, *Cell Res*, 2014, 24(12), 1403-19.
- [33] Roundtree I. A. i wsp., Nuclear m<sup>6</sup>A reader YTHDC1 regulates mRNA splicing, *Trends Genet*, 2016, 32(6), 320-1.
- [34] Fustin J. M. i wsp., XRNA-methylation-dependent RNA processing controls the speed of the circadian clock, *Cell*, 2013, 155(4), 793-806.
- [35] Lin S. i wsp., The m<sup>6</sup>A Methyltransferase METTL3 promotes translation in human cancer cells, *Mol Cell*, 2016, 62(3), 335-45.
- [36] Meyer K. D. i wsp., 5'UTR m<sup>6</sup>A promotes cap-independent translation, *Cell*, 2015, 163(4), 999-1010.
- [37] Zhou J. i wsp., Dynamic m(6)A mRNA methylation directs translational control of heat shock response, *Nature*, 2015, 526(7574), 591-4.
- [38] Zhang C. i wsp., Hypoxia induces the breast cancer stem cell phenotype by HIF-dependent and ALKBH5-mediated m<sup>6</sup>A-demethylation of NANOG mRNA, *PNAS*, 2016, 113(14), E2047-56.
- [39] Dunn D., The occurrence of 1-methyladenine in ribonucleic acid, *Biochim Biophys Acta*, 1961, 46(I), 198-200.
- [40] Dominissini D. i wsp., The dynamic N<sup>1</sup>-methyladenosine methylome in eukaryotic messenger RNA, *Nature*, 2016, 530(7591), 441-6.
- [41] Li X. i wsp., Transcriptome-wide mapping reveals reversible and dynamic N(1)-methyladenosine methylome, *Nat Chem Biol*, 2016, 12(5), 311-6.



# Biologia i fizjologia *Janthinobacterium lividum*

Wiktor Tokarek, Stanisław Listwan

Zakład Fizjologii i Biochemii Roślin, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii,  
Uniwersytet Jagielloński w Krakowie

wiktor.tokarek@student.uj.edu.pl,

Praca napisana pod opieką dra hab. Dariusza Latowskiego

***Janthinobacterium lividum* jest aerobową, Gram-ujemną bakterią, występującą w glebie i zbiornikach wodnych. Gatunek ten zdolny jest do wytwarzania biofilmu. Komórki mogą cechować się ciemnofioletowym zabarwieniem, wynikającym z obecności wiolaceiny - barwnika bis-indolowego o szeroko opisanych właściwościach antybakteryjnych, antygrzybiczych i przeciwnowotworowych. Produkcja tego barwnika związana jest z odpowiedzią na stres i procesem formowania biofilmu. *J. lividum* jest także zdolna do produkcji trzech antybiotyków, zwanych jantinocynami oraz metalo- $\beta$ -laktamaz, co pozwala tej bakterii na osiągnięcie pewnego stopnia oporności na wybrane antybiotyki. *J. lividum* może występować na skórze niektórych płazów, takich jak salamandra *Plethodon cinereus*, co wiąże się z zapobieganiem infekcji grzybem *Batrachochytrium dendrobatidis*. Niniejsza praca stanowi podsumowanie najnowszych informacji dotyczących biologii oraz fizjologii *J. lividum*, ze szczególnym podkreśleniem roli jej metabolitów wtórnych oraz interakcji ekologicznych.**

## Biologia i ekologia *Janthinobacterium lividum*

*Janthinobacterium lividum* (De Ley i wsp. 1978) [1] jest aerobową, Gram-ujemną  $\beta$ -proteobakterią [2, 3]. Do tej pory opisano wiele szczepów i izolatów tej bakterii (tab. 1), a genomy niektórych z nich zostały zsekwencjonowane. Przykładowo, szczep DSM1522 posiada genom o wielkości 6,7 mln par zasad, z czego 62,4% to zasady G i C. W tym genomie znajdują się 5820 geny kodujące, z czego 3,59% związane jest z produkcją metabolitów wtórnych [3]. *J. lividum* posiada szeroko udokumentowane znaczenie w biologicznej odpowiedzi niektórych płazów na infekcje, zwłaszcza grzybiczne [12]. Za pierw-

szorzędny przykład może tutaj posłużyć grzyb *Batrachochytrium dendrobatidis*, powodujący u wybranych gatunków płazów poważne zaburzenia skórne, prowadzące w wielu wypadkach do śmierci zwierzęcia. Infekcje spowodowane przez *B. dendrobatidis* były notowane w rejonach, gdzie populacje różnych gatunków płazów uległy szybkiemu i znacznemu zmniejszeniu, dlatego uważa się, że grzyb ten jest poważnym zagrożeniem dla płazów takich jak: *Bufo marinus* (ropucha olbrzymia), *Mixophyes fasciolatus*, *Eleutherodactylus emcelae* czy *Cochranella albomaculata*. Warto zauwa-

**Tab. 1.** Wybrane szczepy i izolaty *J. lividum* wraz z miejscem ich izolacji

Szczep/izolat	Miejsce izolacji	Źródła
4.11	Jezioro Fryxell, Antarktyda	[4]
BP01, BR01	Rzeka Tanana, Alaska, USA	[5]
EN-3	Jaskinia Altamira, Hiszpania	[6]
G089	Lodowiec Collinsa, Antarktyda	[7]
KT22	Kettle Creek, USA	[8]
MMPP4	Jezioro Manimahesh, Indie	[9]
MTR	Dolina Maipo, Chile	[10]
PGV058	Lodowiec Humboldta, Wenezuela	[11]

żyć, że infekcje wywołane przez *B. dendrobatidis* były odnotowywane w lokacjach bardzo dobrze od siebie izolowanych, np. w Panamie czy w Australii, co dowodzi, że opisywany grzyb jest kosmopolitą a wywoływane przez niego infekcje problemem globalnym [13]. Zaobserwowano gatunek salamandry *Plethodon cinereus*, dla której *J. lividum* wydaje się być symbiontem ograniczającym aktywność grzyba *B. dendrobatidis* poprzez wydzielanie do śluzu owej salamandry metabolitów o działaniu przeciwgrzybiczym takich jak wiolaceina (ryc. 1A). Pozwala to wysnuć wniosek, że *J. lividum* może znaleźć zastosowanie w ratowaniu zagrożonych gatunków płazów [14].

### **Formowanie biofilmu i wytwarzanie wiolaceiny przez *J. lividum***

Biofilm to struktura formowana przez niektóre bakterie, która charakteryzuje się znaczną odpornością mechaniczną oraz często zwiększoną opornością na czynniki antybakteryjne. Biofilm może wykazywać silną adhezję do podłoża i jego usunięcie jest na ogół trudne. Czynnikiem, który warunkuje

mechaniczne własności biofilmu, jest wydzielanie przez komórki bakteryjne mieszaniny polimerów określanej nazwą EPS (ang. *extracellular polymeric substance*). EPS jest uznawany za podstawowy składnik zapewniający trwałość biofilmu. Obecność EPS jest też bardzo dobrym wskaźnikiem zdolności bakterii do formowania biofilmu. Często w tworzeniu biofilmu bardzo ważną rolę pełni zjawisko *quorum sensing*, które w dużym skrócie polega na przekazywaniu informacji pomiędzy bakteriami. Bakterie Gram-ujemne wykorzystują do komunikacji cząsteczki sygnałowe z grupy acylowanych laktonów homoseryny (AHL) [15]. Istnieją doniesienia sugerujące, że produkcja wiolaceiny (zob. dalej) i wytwarzanie biofilmu przez *J. lividum* mogą być regulowane przez ten sam mechanizm. Dane doświadczalne wskazują, że zarówno produkcja wiolaceiny jak i tworzenie biofilmu mogą być stymulowane przez te same czynniki, do których zalicza się glicerol jako główne źródła węgla czy obecność ampicyliny w środowisku. Można wobec powyższego wyciągnąć wniosek, że produkcja wiolaceiny i tworzenie biofilmu mogą być

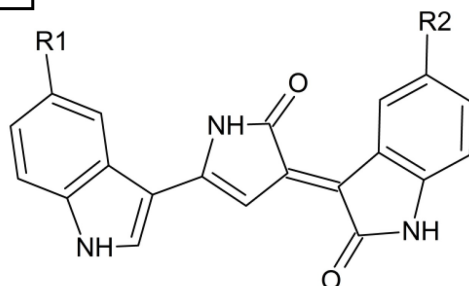
regulowane przez ten sam szlak metaboliczny [16].

### Biologicznie aktywne związki produkowane przez *J. lividum*

Jednym z najważniejszych metabolitów wtórnych produkowanych przez *J. lividum* jest wiolaceina – fioletowy barwnik, będący bisindolową pochodną tryptofanu (ryc. 1A). Jego masa molowa wynosi 343,34 Da. Barwnik ten został po raz pierwszy scharakteryzowany w 1882 roku [17] i od tego czasu jest intensywnie badany [18–21]. Ścieżka biosyntezy wiolaceiny składa się z pięciu reakcji enzymatycznych, katalizowanych przez enzymy oznaczane jako VioA, VioB, VioC, VioD i VioE [22]. Geny kodujące te białka zlokalizowane są na jednym operonie, *vioABCDE* [23]. Najbardziej niezwykły moment biosyntezy tego związku zachodzi na etapie przeprowadzanym przez VioE (ryc. 2). Jest to unikalne przebudowanie pierścienia indolowego, określane w literaturze jako „1,2-shift” [24]. Innym ciekawym aspektem biosyntezy wiolaceiny jest nieenzymatyczna reakcja utlenienia centralnej części cząsteczki [25]. Całościowo, synteza wiolaceiny z L-tryptofanu wymaga utleniania z wykorzystaniem 14 elektronów [26]. Atomy węgla, azotu i wodoru, występujące w cząsteczce tego związku, pochodzą z dwóch wyjściowych cząsteczek L-tryptofanu. Atomy tlenu natomiast pochodzą z tlenu cząsteczkowego [21].

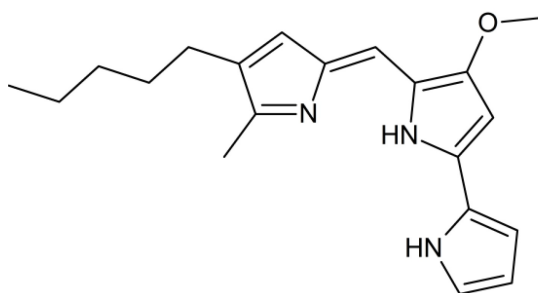
Ten fioletowy barwnik wykazuje szereg biologicznych aktywności (tab. 2). Po pierwsze, wiolaceina funkcjonuje

#### A Wiolaceina i jej pochodne:

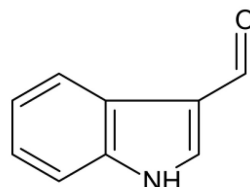


Wiolaceina: R1=OH, R2=H  
Deoksywiołaceina: R1=R2=H  
Oksywiolaceina: R1=R2=OH

#### B Prodigiozyna:

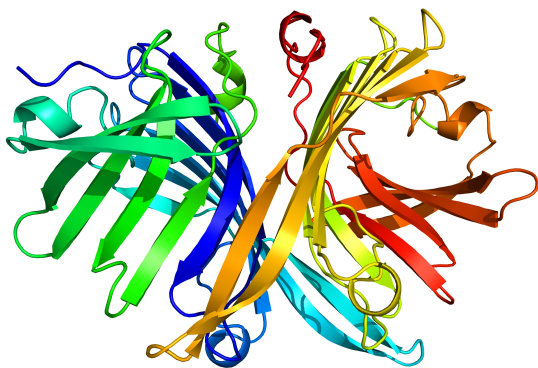


#### C Indolo-3-karboksyaldehyd:



**Ryc. 1.** Wybrane niskocząsteczkowe biologicznie aktywne związki produkowane przez *J. lividum*.

jako antybiotyk – ma ona zdolność do inhibicji wzrostu wielu bakterii, zwłaszcza Gram-dodatnich, wliczając w to groźne patogeny, takie jak *Staphylococcus aureus* czy *Mycobacterium tuberculosis* [27, 28]. Warto także zaznaczyć, że wiolaceina może być z powodzeniem łączona z innymi antybiotykami, takimi jak gentamycyna, kanamycyna czy azytromycyna



**Ryc. 2.** Dimer białka VioE z *Chromobacterium violaceum*, biorącego udział w syntezie wiołaceiny (PDB 3BMZ, [54]).

[29]. Związek ten ma ponadto właściwości przeciwgrzybiczne i przeciwpaśzytnicze. Przykładowo, jest on toksyczny dla nicieni z gatunku *Caenorhabditis elegans*. Działanie to wiąże się z indukcją apoptozy oraz akumulacją komórek *E. coli* w jelitach nicieni [30]. Wiołaceina jest także aktywna przeciwko komórkom zarodźca sierpowatego (*Plasmodium falciparum*) – pierwotniaka wywołującego u ludzi malarię. Ten fioletowy barwnik wykazuje 300-krotnie silniejsze działanie przeciwko zarodźcowi niż lek przeciwmalaryczny – chinina [31, 32]. Do korzystnych właściwości wiołaceiny należy także zaliczyć efekt przeciwnowotworowy, wykazany *in vitro* dla wielu linii komórkowych, a także w modelach *in vivo* [21] (tab. 2). Ten efekt związany jest ze zmianą ekspresji niektórych kinaz, rozpadem aparatu Golgiego, inhibicją metaloproteiny macierzy pozakomórkowej 9, indukcją ścieżki kinaz MAP p44/43, zwiększeniem ekspresji białek BAX i p53, hiperpolaryzacją błony komórkowej i inhibicją autofagii [33–39].

Warto wspomnieć o dwóch najczęściej opisywanych pochodnych wiołaceiny – deoksywiołaceinie i oksywiołaceinie (ryc. 1A). Deoksywiołaceina pozbawiona jest atomu tlenu w pozycji 6 pierścienia indolowego. Powstaje ona, gdy pominięta zostaje reakcja katalizowana przez enzym VioD (hydroksylacja kwasu protodeoksywiołaceinowego do kwasu wiołaceinowego) [51, 52]. W przypadku *J. lividum*, procentowy udział deoksywiołaceiny w porównaniu z zawartością wiołaceiny może sięgać 21% [53]. Oksywiołaceina jest produkowana, gdy jako substrat do ścieżki biosyntezy wiołaceiny zostanie włączony egzogeny 5-hydroksytryptofan. Powstająca cząsteczka posiada dodatkową grupę hydroksylową, nieobecną w cząsteczce wiołaceiny [20]. Oba te związki wykazują silne działanie przeciwko bakteriom Gram-dodatnim i słabe działanie przeciwko bakteriom Gram-ujemnym. Oksywiołaceina wykazuje silniejsze działanie antybakteryjne niż deoksywiołaceina, a ponadto wykazuje silny efekt przeciwgrzybiczny [52]. Deoksywiołaceina odznacza się większą niż wiołaceina fotostabilnością i odpornością na warunki zmiany pH. Dodatkowo, hamuje ona proliferację komórek nowotworowej linii komórkowej HepG2, jednak w tym przypadku nie zaobserwowano zależności tego efektu od dawki związku, jak miało to miejsce w przypadku wiołaceiny. Świadczy to o wpływie ugrupowania hydroksylowego w pozycji 2 na aktywność przeciwnowotworową pochodnych wiołaceiny [51]. Do niskocząsteczkowych związków o znacznej aktywności biologicznej

**Tab. 2.** Wybrane biologiczne właściwości wiolaceiny.

Efekt	Przykłady	Źródła
Przeciwbakteryjny	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus anthracis</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , <i>Vibrio cholerae</i>	[27-29]
Przeciwgrzybiczny	<i>Candida albicans</i> , <i>Trichophyton rubrum</i>	[40]
Przeciw pasożytniczy	<i>Caenorhabditis elegans</i> , <i>Leishmania amazonensis</i> , <i>Plasmodium falciparum</i>	[30,31,41]
Przeciw nowotworowy	Linie komórkowe: Caco-2, HeLa, HEp-2, MCF-7, MOLT-4. Modele <i>in vivo</i> : EAT (myszy), nowotwory głowy i szyi	[39,42-46]
Przeciwutleniający	19% aktywności przeciwutleniającej kwasu askorbinowego, występuje synergia między tymi dwoma związkami	[47]
Inny	Zapobieganie wrzodom żołądka, zapobieganie biegunkom, efekt immunomodulacyjny	[48-50]

produkowanych przez *J. lividum* zaliczyć można prodigiozynę (ryc. 1B). Jest to czerwony barwnik, syntezowany głównie przez szczepy pałeczki krwawej (*Serratia marcescens*). Do tej pory przypisano mu szerokie działanie przeciwmalaryczne, przeciwnowotworowe i przeciwbakteryjne [55]. Produkcję tego związku przez *J. lividum* zaobserwowano podczas zbierania próbek z gleby z terenów Alaski. Niektóre ze szczepów *J. lividum*, takie jak szczep BR01, były zabarwione na czerwono, z powodu produkcji prodigiozyny. Inne szczepy tej bakterii, takie jak BP01 produkowały wiolaceinę i przybierały fioletowe zabarwienie. W obu przypadkach produkcja barwnika wymagała hodowania w niskich temperaturach (<20°C). Odkrycie szczepu BR01 stanowiło pierwszy opis  $\beta$ -proteobakterii zdolnej do produkcji prodigiozyny [5].

Kolejnym biologicznie aktywnym metabolitem wtórnym *J. lividum* jest indolo-3-karboksyaldehyd (ryc. 1C). Wykazuje on działanie przeciwgrzybiczne, np. w stosunku do wspomnianego powy-

żej pasożyta *B. dendrobatidis*, jednak w tym przypadku owo działanie jest dużo słabsze od efektu wywieranego przez wiolaceinę [14].

Opisane powyżej cząsteczki nie są jedynymi związkami o antybakteryjnym działaniu występującymi w komórkach *J. lividum*. Wykryto także obecność jantinocyn – laktonowych antybiotyków o strukturze deka-peptydów (ryc. 3). Zidentyfikowano trzy takie związki, oznaczone jako A, B i C. W ich strukturze chemicznej występują reszty aminokwasów takich jak L-izoleucyna, erytro- $\beta$ -hydroksy-D-leucyna, L-treonina, L-seryna, kwas 2-3-dehydro- $\alpha$ -aminomasłowy, D-seryna, D-ornityna, L-fenylalanina oraz specjalna reszta, charakterystyczna dla danego antybiotyku. Są to  $\beta$ -hydroksytryptofan (jantinocyna A),  $\beta$ -ketotryptofan (formy enolowe Z i E; jantinocyna B) i dehydrotryptofan (jantinocyna C). Podczas rozwiązywania struktur chemicznych tych związków zauważono, że reszty erytro- $\beta$ -hydroksy-D-leucyny,  $\beta$ -hydroksytryptofanu i  $\beta$ -ketotryptofanu nie zostały wcześniej opisane w naturalnie



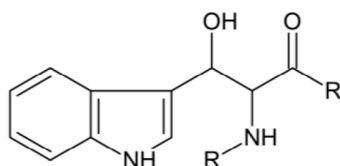
L-Ile – D-erythro-βHL – L-Thr – L-Ser – D-erythro-βHL – ΔAbu – D-Ser – X – D-Orn – L-Phe

ΔAbu = kwas 2,3-dehydro-α-aminomasłowy

βHL = β-hydroksylizyna

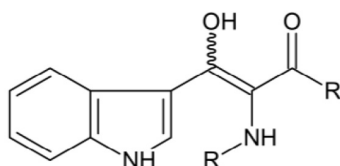
#### Jantynocyna A:

X = β-hydroksytryptofan



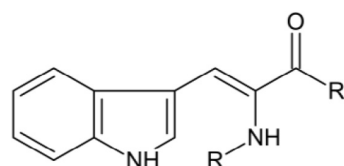
#### Jantynocyna B:

X = β-ketotryptofan (enole Z i E)



#### Jantynocyna C:

X = dehydrotryptofan



**Ryc. 3.** Sekwencja aminokwasowa jantynocyn (górną) z przedstawieniem struktur chemicznych specjalnych reszt (X) charakterystycznych dla danego typu jantynocyny (dół). R – pozostałe aminokwasy sekwencji przedstawionej na górnym panelu (za [56])

występujących peptydach [56]. Ogólna charakterystyka działania przeciwbakteryjnego jantynocyn jest zbliżona do działania wankomycyny, aktywnej głównie przeciw bakteriom Gram-dodatnim. Jantynocyny A i B są także umiarkowanie aktywne przeciw bakteriom Gram-ujemnym. Warto podkreślić, że aktywność tych dwóch antybiotyków przewyższa aktywność wankomycyny w przypadku antybiotkoopornych szczepów bakterii Gram-dodatnich, takich jak *S. aureus* czy *S. epidermidis*. Ponadto, mieszanina jantynocyn A i B jest znacząco bardziej aktywna przeciwko anaerobowym bakteriom (głównie Gram-dodatnim), takim jak *Clostridium perfringens*, niż wankomycyna. Badania *in vivo* na modelu mysim jantynocyny A i B wykazały większą toksyczność w porównaniu do wankomycyny (podawanie dożylnie). Przy zastosowaniu modelu systemowej infekcji *S. aureus*, jantynocyna B odznaczyła się niższymi wartościami ED<sub>50</sub> w porównaniu do wankomycyny i cefalotyny [57].

Komórki *J. lividum* zdolne są do produkcji pewnych antybiotyków, jednak z drugiej strony posiadają one mechanizmy dające oporność względem innych antybiotyków. W 2001 roku pojawiły się pierwsze doniesienia o występowaniu aktywności metalo-β-laktamazowej (a konkretnie karbapenemazowej) w izolatach tej bakterii. Metallo-β-laktamazy są enzymami zdolnymi do hydrolizy pierścienia β-laktamowego, przez co pozwalają na nabycie oporności na antybiotyki zawierające ten element strukturalny. Wykazano, że *J. lividum* syntetyzuje taki enzym, nazwany THIN-B. Należy on do β-laktamaz podklasy B3 i jest najbardziej podobny do laktamazy L1 z *Stenotrophomonas maltophilia* [58, 59]. Białko to ma masę cząsteczkową równą 31 kDa i funkcjonuje jako monomer [60].

## Podsumowanie

*J. lividum* jest niewątpliwie ciekawą bakterią i interesującym obiektem ba-



dań. W niniejszej pracy przedstawiono wybrane aspekty fizjologii tego organizmu, zwłaszcza te dotyczące jego znaczenia w ekologicznych interakcjach między płazami i ich pasożytami oraz opisano najważniejsze metabolity

wtórne i enzymy produkowane przez tę bakterię. Warto jednak zauważyć, że jest ona analizowana także w innych aspektach [61–64], co podkreśla znaczenie tego organizmu w badaniach podstawowych.

## Bibliografia:

- [1] De Ley J. i wsp., Intra- and intergeneric similarities of *Chromobacterium* and *Janthinobacterium* ribosomal ribonucleic acid cistrons, *Int J Syst Bacteriol*, 1978, 28(2), 154-68.
- [2] Gillis M. i wsp., The genera *Chromobacterium* and *Janthinobacterium* [w:] *The prokaryotes*. Volume 5: Proteobacteria: alpha and beta subclasses, red Dworkin M. i wsp., 2006, 737-46.
- [3] Haack F. S. i wsp., Molecular keys to the *Janthinobacterium* and *Duganella* spp. interaction with the plant pathogen *Fusarium graminearum*, *Front Microbiol*, 2016, 7, 1668.
- [4] Brambilla E. i wsp., 16S rDNA diversity of cultured and uncultured prokaryotes of a mat sample from Lake Fryxell, McMurdo Dry Valleys, Antarctica, *Extremophiles*, 2001, 5(1), 23-33.
- [5] Schloss P. D. i wsp., Psychrotrophic strain of *Janthinobacterium lividum* from a cold Alaskan soil produces prodigiosin, *DNA Cell Biol*, 2010, 29(9), 533-41.
- [6] Laiz L. i wsp., Microbiological study of the dripping waters in Altamira cave (Santillana del Mar, Spain), *J Microbiol Methods*, 1999, 36(1-2), 129-38.
- [7] García-Echauri S. A. i wsp., Isolation and phylogenetic classification of culturable psychrophilic prokaryotes from the Collins glacier in the Antarctica, *Folia Microbiol (Praha)*, 2011, 56(3), 209-14.
- [8] Saeger J. L. i wsp., Genetic variation within a lotic population of *Janthinobacterium lividum*, *Appl Environ Microbiol*, 1993, 59(7), 2214-19.
- [9] Suman R. i wsp., A novel psychrophilic *Janthinobacterium lividum* MMPP4 isolated from Manimahesh Lake of Chamba District of Himachal Pradesh, India, *J Biochem Tech*, 2015, 6(1), 846-51.
- [10] Valdes N. i wsp., Draft genome sequence of *Janthinobacterium lividum* strain MTR reveals its mechanism of capnophilic behavior, *Stand Genomic Sci*, 2015, 10, 110.
- [11] Ball M. M. i wsp., Bacteria recovered from a high-altitude, tropical glacier in Venezuelan Andes, *World J Microbiol Biotechnol*, 2014, 30(3), 931-41.
- [12] Walke J. B. i wsp., Harnessing the microbiome to prevent fungal infections: lessons from amphibians, *PLoS Pathog*, 2016, 12(9), e1005796.
- [13] Berger L. i wsp., Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America, *PNAS*, 1998, 95(15), 9031-6.
- [14] Brucker R. M. i wsp., Amphibian chemical defense: antifungal metabolites of the microsymbiont *Janthinobacterium lividum* on the salamander *Plethodon cinereus*, *J Chem Ecol*, 2008, 34(11), 1422-9.
- [15] Kołwzan B., Analiza zjawiska biofilmu – warunki jego powstawania i funkcjonowania, *Ochrona Środowiska*, 2011, 33(4), 3-14.
- [16] Pantanella F. i wsp., Violacein and biofilm production in *Janthinobacterium lividum*, *J Appl Microbiol*, 2007, 102(4), 992-9.
- [17] Boisbaudran L. D. E., Matière colorante se formant dans la colle de farine, *Compt rend*, 1882, 94, 562.
- [18] DeMoss R. D., Violacein, [w:] red Gottlieb D. i wsp., *Biosynthesis*, Springer Berlin Heidelberg, 1967, 77-81.
- [19] Durán M. i wsp., *Chromobacterium violaceum* and its important metabolites – review, *Folia Microbiol (Praha)*, 2010, 55(6),

535-47.

[20] Choi S. Y. i wsp., Violacein: properties and production of a versatile bacterial pigment, *Biomed Res Int*, 2015, 465056.

[21] Durán N. i wsp., Advances in *Chromobacterium violaceum* and properties of violacein-Its main secondary metabolite: A review, *Biotechnol Adv*, 2016, 34(5), 1030-45.

[22] Alkhalaf L. M. i wsp., Biosynthetic manipulation of tryptophan in bacteria: pathways and mechanisms, *Chem Biol*, 2015, 22(3), 317-28.

[23] August P. R. i wsp., Sequence analysis and functional characterization of the violacein biosynthetic pathway from *Chromobacterium violaceum*, *J Mol Microbiol Biotechnol*, 2000, 2(4), 513-9.

[24] Hoshino T. i wsp., Biosynthesis of violacein: a novel rearrangement in tryptophan metabolism with a 1,2-shift of the indole ring, *Agric Biol Chem*, 1987, 51(3), 965-8.

[25] Shinoda K. i wsp., Biosynthesis of violacein: a genuine intermediate, protoviolaceinic acid, produced by VioABDE, and insight into VioC function, *Chem Commun (Camb)*, 2007, (40), 4140-2.

[26] Balibar C. J. i wsp., *In vitro* biosynthesis of violacein from L-tryptophan by the enzymes VioA-E from *Chromobacterium violaceum*, *Biochemistry*, 2006, 45(51), 15444-57.

[27] Lichtenstein H. C. i wsp., Violacein, an antibiotic pigment produced by *Chromobacterium violaceum*, *J Infect Dis*, 1945, 76(1), 47-51.

[28] Mojib N. i wsp., Antimycobacterial activity in vitro of pigments isolated from Antarctic bacteria, *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2010, 98(4), 531-40.

[29] Subramaniam S. i wsp., Synergistic antimicrobial profiling of violacein with commercial antibiotics against pathogenic micro-organisms, *Pharm Biol*, 2014, 52(1), 86-90.

[30] Ballestriero F. i wsp., Antinematode activity of violacein and the role of the insulin/IGF-1 pathway in controlling violacein sensitivity in *Caenorhabditis elegans*, *PLoS One*, 2014, 9(10), e109201.

[31] Lopes S. C. i wsp., Violacein extracted from *Chromobacterium violaceum* inhibits *Plasmodium* growth *in vitro* and *in vivo*, *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, 53(5), 2149-52.

[32] Durán N. i wsp., Violacein: properties and biological activities, *Biotechnol Appl Biochem*, 2007, 48(Pt 3), 127-33.

[33] Queiroz K. C. i wsp., Violacein induces death of resistant leukaemia cells via kinome reprogramming, endoplasmic reticulum stress and Golgi apparatus collapse, *PLoS One*, 2012, 7(10), e45362.

[34] Platt D. i wsp., Violacein inhibits matrix metalloproteinase mediated CXCR4 expression: potential anti-tumor effect in cancer invasion and metastasis, *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 455(1-2), 107-12.

[35] Leal A. M. i wsp., Violacein induces cell death by triggering mitochondrial membrane hyperpolarization in vitro, *BMC Microbiol*, 2015, 15, 115.

[36] Mehta T., Violacein induces p44/42 mitogen-activated protein kinase-mediated solid tumor cell death and inhibits tumor cell migration, *Mol Med Rep*, 2015, 12(1), 1443-8.

[37] Alshatwi A. A. i wsp., Violacein induces apoptosis in human breast cancer cells through up regulation of BAX, p53 and down regulation of MDM2, *Exp Toxicol Pathol*, 2016, 68(1), 89-97.

[38] Gonçalves P. R. i wsp., Violacein induces death of RAS-mutated metastatic melanoma by impairing autophagy process, *Tumour Biol*, 2016, 37(10), 14049-58.

[39] Masuelli L. i wsp., Violacein, an indole-derived purple-colored natural pigment produced by *Janthinobacterium lividum*, inhibits the growth of head and neck carcinoma cell lines both *in vitro* and *in vivo*, *Tumour Biol*, 2016, 37(3), 3705-17.

[40] Sasidharan A. i wsp., Antifungal activity of violacein purified from a novel strain of *Chromobacterium* sp. NIIST (MTCC 5522), *J Microbiol*, 2015, 53(10), 694-701.

[41] Leon L. L. i wsp., Antileishmanial activity of the violacein extracted from *Chromobacterium violaceum*, *J Antimicrob Chemother*, 2001, 48(3),

449-50.

[42] de Carvalho D. D. i wsp., Cytotoxic activity of violacein in human colon cancer cells, *Toxicol In Vitro*, 2006, 20(8), 1514-21.

[43] Hashimi S. M. i wsp., Violacein anticancer activity is enhanced under hypoxia, *Oncol Rep*, 2015, 33(4), 1731-6.

[44] Andrighetti-Fröhner C. R. i wsp., Cytotoxicity and potential antiviral evaluation of violacein produced by *Chromobacterium violaceum*, *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2003, 98(6), 843-8.

[45] Melo P. S. i wsp., Violacein cytotoxicity and induction of apoptosis in V79 cells, *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2000, 36(8), 539-43.

[46] Bromberg N. i wsp., Growth inhibition and pro-apoptotic activity of violacein in Ehrlich ascites tumor, *Chem Biol Interact*, 2010, 186(1), 43-52.

[47] Suryawanshi R. K. i wsp., Towards an understanding of bacterial metabolites prodigiosin and violacein and their potential for use in commercial sunscreens, *Int J Cosmet Sci*, 2015, 37(1), 98-107.

[48] Durán N. i wsp., Evaluation of the antiulcerogenic activity of violacein and its modulation by the inclusion complexation with beta-cyclodextrin, *Can J Physiol Pharmacol*, 2003, 81(4), 387-96.

[49] Antonisamy P. i wsp., Anti-diarrhoeal and ulcer-protective effects of violacein isolated from *Chromobacterium violaceum* in Wistar rats, *Fundam Clin Pharmacol*, 2009, 23(4), 483-90.

[50] Antonisamy P. i wsp., Immunomodulatory, analgesic and antipyretic effects of violacein isolated from *Chromobacterium violaceum*, *Phytomedicine*, 2010, 17(3-4), 300-4.

[51] Jiang P. X. i wsp., Pathway redesign for deoxyviolacein biosynthesis in *Citrobacter freundii* and characterization of this pigment, *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012, 94(6), 1521-32.

[52] Wang H. i wsp., Biosynthesis and characterization of violacein, deoxyviolacein and oxyviolacein in heterologous host, and their antimicrobial activities, *Biochem Eng J*, 2012, 67, 148-55.

[53] Rodrigues A. L. i wsp., Microbial production

of the drugs violacein and deoxyviolacein: analytical development and strain comparison, *Biotechnol Lett*, 2012, 34(4), 717-20.

[54] Ryan K. S. i wsp., The violacein biosynthetic enzyme VioE shares a fold with lipoprotein transporter proteins, *J Biol Chem*, 2008, 283(10), 6467-75.

[55] Darshan N. i wsp., Prodigiosin and its potential applications, *J Food Sci Technol*, 2015, 52(9), 5393-407.

[56] Johnson J. H. i wsp., Janthinocins A, B and C, novel peptide lactone antibiotics produced by *Janthinobacterium lividum*. II. Structure elucidation, *J Antibiot (Tokyo)*, 1990, 43(8), 920-30.

[57] O'Sullivan J. i wsp., Janthinocins A, B and C, novel peptide lactone antibiotics produced by *Janthinobacterium lividum*. I. Taxonomy, fermentation, isolation, physico-chemical and biological characterization, *J Antibiot (Tokyo)*, 1990, 43(8), 913-9.

[58] Rossolini G. M. i wsp., Metallo-beta-lactamase producers in environmental microbiota: new molecular class B enzyme in *Janthinobacterium lividum*, *Antimicrob Agents Chemother*, 2001, 45(3), 837-44.

[59] Hall B. G. i wsp., The metallo-beta-lactamases fall into two distinct phylogenetic groups, *J Mol Evol*, 2003, 57(3), 249-54.

[60] Docquier J. D. i wsp., Biochemical characterization of the THIN-B metallo-beta-lactamase of *Janthinobacterium lividum*, *Antimicrob Agents Chemother*, 2004, 48(12), 4778-83.

[61] Molloy C. i wsp., Expression and secretion of *Janthinobacterium lividum* chitinase in *Saccharomyces cerevisiae*, *Biotechnol Lett*, 1997, 19(11), 1161-4.

[62] Kawakami R. i wsp., Gene cloning and characterization of the very large NAD-dependent l-glutamate dehydrogenase from the psychrophile *Janthinobacterium lividum*, isolated from cold soil, *J Bacteriol*, 2007, 189(15), 5626-33.

[63] Kawakami R. i wsp., The unique kinetic behavior of the very large NAD-dependent glutamate dehydrogenase from

*Janthinobacterium lividum*, Biosci Biotechnol Biochem, 2010, 74(4), 884-7.

[64] Kawakami R. i wsp., Identification of catalytic residues of a very large NAD-glutamate

dehydrogenase from *Janthinobacterium lividum* by site-directed mutagenesis, Biosci Biotechnol Biochem, 2014, 78(12), 2045-50.

# Nanocząstki złota - piękne i mądre, czyli wykorzystanie nanozłota do konstrukcji sond molekularnych i w diagnostyce

Olga Perzanowska

Koło Naukowe Chemii Biologicznej „Nukleotyd”

Kolegium Międzywydziałowych Indywidualnych Studiów Matematyczno-Przyrodniczych

Uniwersytet Warszawski

olga.perzanowska@student.uw.edu.pl

Praca napisana pod opieką dra hab. Jacka Jemielitego, prof. UW

**Złoto od zawsze budziło fascynację i do dziś cenione jest ze względu na swoje walory estetyczne. Jednakże już od wieków nie tylko piękny wygląd złota decydował o jego popularności. Pierwsza książka dotycząca koloidalnego złota i jego medycznych właściwości powstała już w 1618 roku. Obecnie nanocząstki złota (AuNPs) wykorzystywane są w wielu dziedzinach ze względu na ich szczególne właściwości optyczne, elektryczne i magnetyczne, których nie posiadają większe obiekty zbudowane z tych samych atomów. Spektroskopowe właściwości nanocząstek, takie jak czułość widma absorpcyjnego na zmianę ligandów tworzących ich otoczkę, zdolność do wygaszania fluorescencji znajdujących się w pobliżu fluoroforów, czy choćby wyraźna zmiana koloru roztworu AuNPs pod wpływem agregacji, znalazły wielorakie zastosowanie w nauce. Nie mniej ważne okazują się być właściwości elektryczne i magnetyczne AuNPs, wykorzystywane chociażby w badaniach z użyciem wzmocnionej powierzchniowo spektroskopii ramanowskiej (SERS). W poniższym artykule przytoczone zostaną koronne przykłady wykorzystania wyjątkowych właściwości nanozłota w nauce.**

## Wstęp

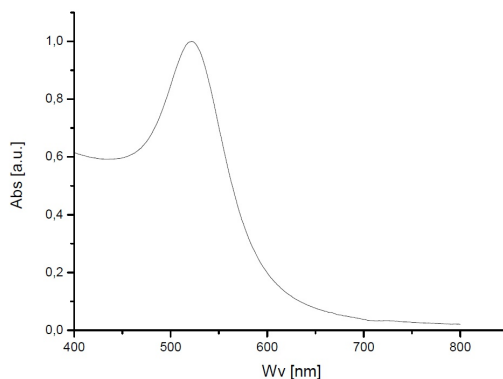
Nanocząstki złota (AuNPs) są to obiekty zbudowane z atomów złota o rozmiarach od kilku- do kilkudziesięciu nanometrów średnicy. To właśnie niewielkim rozmiarom zawdzięczają one swoje szczególne właściwości optyczne, elektryczne czy magnetyczne. Ma to związek z występowaniem tzw. kwantowego efektu rozmiarowego [1]. Zmniejszenie rozmiarów cząsteczki metalu, w tym przypadku złota, powo-

duje spadek gęstości dopuszczalnych stanów energetycznych w paśmie walencyjnym oraz paśmie przewodzenia takiej cząsteczki. To z kolei prowadzi do sytuacji, w której z pozornie ciągłego układu stanów energetycznych, jaki charakteryzuje duże skupiska atomów metalu, następuje przejście do struktury dyskretnych, nieciągłych stanów energetycznych, w jakich znaleźć mogą się elektrony po pochłonięciu odpo-

wiedniej, skwantowanej, porcji energii [2].

Szczególną popularność w nauce zyskały sobie właściwości optyczne nanocząstek złota. AuNPs posiadają zdolności do silnej absorpcji i rozpraszania promieniowania elektromagnetycznego, co jest związane z występowaniem zlokalizowanego powierzchniowego rezonansu plazmonowego. Plazmon jest to drganie oscylacyjne chmury swobodnych elektronów znajdujących się w nanocząstce złota [3]. Pod wpływem działania fali elektromagnetycznej swobodne elektrony zaczynają przemieszczać się na jedną stronę cząsteczki, dzięki czemu powstaje dipol. Jedna część cząsteczki ma przeważający ładunek ujemny, a druga w efekcie niedoboru elektronów – ładunek dodatni.

Częstość rezonansowa drgania takiego dipola zwana jest częstością rezonansową plazmonu [4]. Szczególnie istotny jest fakt, że częstość rezonansowa plazmonu nanocząstek złota mieści się w zakresie światła widzialnego i odpowiada fali o długości około 520nm [5] (ryc. 1). Poza silną absorpcją światła widzialnego, AuNPs wykazują również zdolność do wygaszania fluorescencji znajdujących się w pobliżu fluoroforów, zarówno na drodze promienistego jak i bezpromienistego transferu energii [6]. W przypadku dużego nakładania widm absorpcji i emisji nanocząstek i fluorofora, wygaszanie fluorescencji jest przede wszystkim wynikiem pochłaniania światła emitowanego przez fluorofor przez nanocząstki znajdujące się w pobliżu w roztworze. Jednakże udowodniono



**Ryc. 1.** Widmo absorpcyjne nanocząstek złota o średnicy 20nm.

zachodzenie również dodatkowego zjawiska, a mianowicie rezonansowego transferu energii (FRET). Udowodniono, że dla układów, w których fluorofor jest związany z powierzchnią nanocząstki, a odległość fluoryzującego fragmentu cząsteczki od tej powierzchni jest nie większa niż 5nm, obserwować będziemy zachodzenie FRET [7].

### **Sondy molekularne oparte na kontrolowanej agregacji**

Ze względu na możliwość łatwej modyfikacji powierzchni nanocząstek złota [8] oraz czułość ich widma absorpcyjnego na zmianę otoczki i agregację, AuNPs znalazły szerokie zastosowanie w konstrukcji sond molekularnych. Szczególnie ciekawym przykładem wykorzystania kontrolowanej agregacji nanocząstek złota do wykrywania fragmentów DNA w roztworze przedstawiona została w pracy Elghanian i wsp. [9]. Dwa rodzaje nanocząstek – modyfikowane dwoma typami oligonukleotydów komplementarnych do sąsiadujących części badanego



fragmentu DNA – mieszano w roztworze, a następnie dodawano cząsteczki analitu, czyli oznaczanej sekwencji kwasu deoksyrybonukleinowego. W momencie związania obu typów oligonukleotydów znajdujących się na powierzchni AuNPs do cząsteczek analitu, dochodziło do zbliżenia dwóch nanocząstek, czyli ich kontrolowanej agregacji. W wyniku zbliżenia dwóch lub więcej nanocząstek dochodzi do sprzęgania plazmonów i przesunięcia ich maksimum absorpcji w kierunku fal dłuższych. Jest to proces łatwy do zaobserwowania gołym okiem, jako że roztwór nanocząstek złota zmienia kolor z ciemnoczerwonego na niebieski. Autorzy artykułu postulują, że skonstruowana przez nich sonda molekularna może posłużyć do wykrywania nawet femtomolowych ilości DNA. Tego typu sonda przeznaczona jest do wykorzystania w diagnostyce chorób genetycznych i patogenicznych. Kontrolowana agregacja nanocząstek złota znalazła również zastosowanie w konstrukcji tzw. linijek plazmonowych [10]. Sonnichsen i wsp. zaproponowali wykorzystanie zjawiska sprzęgania plazmonów AuNPs do konstrukcji molekularnych urządzeń zdolnych do pomiarów odległości między dwiema nanocząstkami. Stopień przesunięcia maksimum absorpcyjnego widma zbliżonych do siebie nanocząstek jest bezpośrednim wskaźnikiem odległości pomiędzy nimi. Odległość z kolei zależy od długości i charakteru (giętkości, skłonności do zwijania itd.) użytej cząsteczki wiążącej obie nanocząstki. W konstrukcji „linijki” jako cząsteczki wiążącej wykorzystano za-

równo jedno- jak i dwuniciowe fragmenty DNA (ssDNA i dsDNA). Zaproponowana metoda pozwala na badanie procesów hybrydyzacji odcinków DNA *in vitro*, jak również wykrywanie bardzo niewielkich ilości DNA genomowego w roztworze.

### **Sondy molekularne oparte na wygaszaniu fluorescencji**

Wygaszanie fluorescencji przez nanocząstki złota jest kolejnym niezwykle użytecznym zjawiskiem. Ponownie, istotnym czynnikiem w konstrukcji sond molekularnych jest możliwość łatwej modyfikacji nanocząstek złota. W pracy Ao i wsp. [11] nanocząstki wykorzystane zostały do opracowania immunoeseju umożliwiającego określenie ilości alfa-fetoproteiny (AFP) w roztworze. Białko to jest znanym biomarkerem raka wątrobowokomórkowego, wzrost jego stężenia w surowicy może wskazywać na proces szybkiego wzrostu komórek rakowych w wątrobie. Autorzy publikacji proponują wykorzystanie skonstruowanej przez nich sondy molekularnej do badania poziomu stężenia owego białka. Wykorzystane zostały dwa rodzaje nanocząstek – magnetyczne oraz złote. Powierzchnie obu typów nanocząstek pokryte zostały przeciwciałami poliklonalnymi AFP. W pierwszej kolejności do roztworu cząstek magnetycznych wprowadzane było białko AFP i ulegało związaniu przez przeciwciała na powierzchni nanocząstek. W drugim kroku do roztworu wprowadzano w nadmiarze nanocząstki złota, które również wiązały oznaczane białko i po-

wstawał kompleks dwóch rodzajów nanocząstek połączonych cząsteczką AFP. Nadmiar AuNPs usuwano z roztworu, a te wchodzące w skład kompleksów odłączane były pod wpływem działania pola magnetycznego. Następnie do roztworu wprowadzano cząsteczki fluoresceiny, zmodyfikowane tak, by wiązane były do powierzchni AuNPs. Stopień wygaszenia fluorescencji barwnika zależał od stężenia nanocząstek złota w roztworze i tym samym wskazywał na ilość znajdującego się tam białka AFP.

Badanie procesów hybrydyzacji DNA, co jak już wspomniano znajduje zastosowanie w diagnostyce chorób genetycznych oraz przy wykrywaniu patogenów, jest również możliwe z wykorzystaniem zjawiska wygaszania fluorescencji przez nanocząstki złota. W pracy Li i wsp. [12] wykorzystano fakt, że jedno- i dwuniciowe fragmenty DNA wykazują różne powinowactwo do ujemnie naładowanych powierzchni AuNPs. W szczególności wyznakowane fluorescencyjnie jednoniciowe DNA przykleja się do powierzchni nanocząstek, co można zaobserwować jako spadek intensywności fluorescencji użytego barwnika. Z kolei dsDNA nie wykazuje takiego powinowactwa. Tak więc wprowadzenie do roztworu zawierającego niewielkie ilości oznaczanych oligonukleotydów zarówno znakowanych fluorescencyjnie fragmentów DNA oraz nanocząstek złota, skutkuje albo stałym poziomem fluorescencji, jeśli fragmenty DNA są komplementarne, albo jej spadkiem, w sytuacji gdy odcinki DNA nie pasują do siebie. Jest to kolejny przykład na

prosty i wydajny sposób wykrycia nawet bardzo niewielkich ilości konkretnych fragmentów DNA w roztworze.

## **Wykorzystanie nanocząstek złota w badaniach SERS**

Wzmocniona powierzchniowo spektroskopia ramanowska (SERS) jest to metoda oparta na wzmocnieniu sygnału ramanowskiego badanej substancji w wyniku umieszczenia jej na powierzchni metalicznej, takiej jak złoto, srebro czy miedź [13]. Efekt wzmocnienia można zaobserwować zarówno w badaniach na metalicznym podłożu stałym, jak i w roztworze nanocząstek. Dotychczas brak jednej teorii tłumaczącej występowanie tego efektu, jednakże jedno z podejść uważanych jest obecnie za najbliższe prawdy. Mianowicie zakłada się, że w wyniku działania promieniowania elektromagnetycznego plazmon znajdujący się na powierzchni metalicznej wpada w rezonans i w efekcie cząsteczki umiejscowione w pobliżu tej powierzchni znajdują się w bardzo silnym polu elektromagnetycznym. Pole to potęguje zarówno siłę promieniowania wzbudzającego badane cząsteczki, jak i emitowanego przez nie sygnału ramanowskiego.

Wzmocnienie sygnału, może być na tyle znaczące, by umożliwić detekcję nawet pojedynczych molekuł [14]. Przewaga wynikająca z niezwyklej czułości metody SERS została wykorzystana do badania procesów wnikania nanocząstek złota do komórek [15]. Wnikające do komórek AuNPs powodują wzmocnienie sygnałów ramanow-

skich znajdujących się w ich pobliżu naturalnych składników komórkowych, takich jak białka, co umożliwia stworzenie mapy ułożenia nanocząstek złota w komórkach i obserwację ich rozprzestrzeniania w czasie.

Zdolność do obserwacji „na żywo” zachowania nanocząstek złota w środowisku komórkowym z wykorzystaniem metody SERS stworzyła wiele możliwości z zakresu obrazowania komórkowego. Jednym z ciekawszych przykładów jest opisane w pracy Kang i wsp. [16] wykorzystanie nanocząstek złota zdolnych do wiązania do konkretnych organelli komórkowych. Wykorzystano trzy rodzaje AuNPs – każdy typ nanocząstek wzbogacony został o odpowiednią cząsteczkę barwnika ramanowskiego oraz cząsteczkę sygnałową kierującą nanocząstki do cytoplazmy lub umożliwiającą wiązanie do jądra komórkowego lub mitochondrium.

Z wykorzystaniem konfokalnej mikroskopii ramanowskiej o dużej rozdzielczości czasowej możliwe było zaobserwowanie przemieszczania się wyznakowanych nanocząstek wewnątrz komórki oraz wiązanie ich do odpowiednich organelli. Metoda nie jest szkodliwa dla badanych komórek, jak również umożliwia wysokiej jakości obrazowanie komórkowe. Zgodnie z postulatem autorów artykułu może ona znaleźć wykorzystanie chociażby

w badaniu odpowiedzi komórek na działanie leków.

## Podsumowanie

Nanocząstki złota są to niezwykle ciekawe z punktu naukowego obiekty, których szczególne właściwości optyczne, elektryczne i magnetyczne znalazły wiele zastosowań. Istnieje wiele nowatorskich rozwiązań, których wprowadzenie możliwe było tylko dzięki kreatywnemu wykorzystaniu nanocząstek złota. Na szczególną uwagę zasługują prace opisujące użycie nanocząstek złota w konstrukcji sond molekularnych. Wykorzystane zostały takie zjawiska, jak kontrolowana agregacja nanocząstek złota pozwalająca na kolorymetryczną obserwację zachodzących z ich udziałem procesów, czy wygaszanie fluorescencji umożliwiające łatwą obserwację procesów przyłączania się cząsteczek fluorescencyjnych do powierzchni AuNPs. Również w metodzie SERS nanocząstki złota znalazły niezwykle ciekawe zastosowania umożliwiające chociażby obrazowanie komórkowe. Opisane w artykule rozwiązania z wykorzystaniem nanocząstek złota przysłużyć się mogą w takich dziedzinach, jak diagnostyka chorób genetycznych, patogenicznych czy nowotworowych, czy wpływ działania leków na żywe komórki.

## Bibliografia:

[1] Daniel M. i wsp., Gold nanoparticles: Assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology, Chem

Rev, 2004, 104(1), 293-346.

[2] Schmid G., Large clusters and colloids. Metals in the embryonic state, Chem Rev, 1992, 92(8), 1709-27.

- [3] Barnes W. L. i wsp., Surface plasmon subwavelength optics, *Nature*, 2003, 424, 824-30.
- [4] Ghosh S. K. i wsp., Interparticle coupling effect on the Surface Plasmon Resonance of gold nanoparticles: from theory to applications, *Chem Rev*, 2007, 107, 4797-862.
- [5] Eustis S. i wsp., Why gold nanoparticles are more precious than pretty gold: Noble metal surface plasmon resonance and its enhancement of the radiative and nonradiative properties of nanocrystals of different shapes, *Chem Soc Rev*, 2006, 35, 209-17.
- [6] Dulkeith E. i wsp., Fluorescence quenching of dye molecules near gold nanoparticles: Radiative and nonradiative effects, *Phys Rev Lett*, 2002, 89, 203002.
- [7] Anger P. i wsp., Enhancement and quenching of single-molecule fluorescence, *Phys Rev Lett*, 2006, 96, 113002.
- [8] Love C. i wsp., Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology, *Chem Rev*, 2005, 105, 1103-69.
- [9] Elghanian R. i wsp., Selective colorimetric detection of polynucleotides based on the distance-dependent optical properties of gold nanoparticles, *Science*, 1997, 277(5329), 1078-81.
- [10] Sönnichsen C. i wsp., A molecular ruler based on plasmon coupling of single gold and silver nanoparticles, *Nature Biotechnology*, 2005, 23(6), 741-5.
- [11] Ao L. i wsp., Fluoroimmunoassay for antigen based on fluorescence quenching signal of gold nanoparticles, *Anal Chem*, 2006, 78, 1104-6.
- [12] Li H. i wsp., DNA sequence detection using selective fluorescence quenching of tagged oligonucleotide probes by gold nanoparticles, *Anal Chem*, 2004, 76, 5414-7.
- [13] Fleischmann M. i wsp., Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode, *Chem Phys Lett*, 1974, 26(2), 163-6.
- [14] Nie S. i wsp., Probing single molecules and single nanoparticles by surface-enhanced Raman scattering, *Science*, 1997, 275(5303), 1102-6.
- [15] Kneipp K. i wsp., Surface-enhanced Raman spectroscopy in single living cells using gold nanoparticles, *App Spec*, 2002, 56(2), 150-4.
- [16] Kang J. W. i wsp., High resolution live cell Raman imaging using subcellular organelle-targeting SERS-sensitive gold nanoparticles with highly narrow intra-nanogap, *Nano Lett*, 2015, 15(3), 1766-72.

# Ewolucyjna biologia rozwoju a paleontologia

Edwin Sieredziński  
colonelvolf@gmail.com

**Paleontologia oraz biologia rozwoju wydawać się mogą bardzo odległymi polami badawczymi. Jednakże w ostatnich czasach, w trakcie pogłębiającej się biologicznej emancypacji paleontologii, okazuje się, że te dziedziny mają ze sobą styk. Dotyczy on przemian makroewolucyjnych takich jak np. eksplozja kambryjska. Jak bowiem wyjaśnić dość nagłe pojawienie się w zapisie kopalnym większości znanych współcześnie typów zwierząt, czy ów zapis kopalny powinien być interpretowany literalnie? Wiąże się to z klasą problemów często poruszanych przez paleontologów dotyczących przemian makroewolucyjnych, czy miały one z kolei charakter skokowy (punktualistyczny) czy ciągły (gradualistyczny). Można wskazać również dalsze problemy o charakterze bardziej szczegółowym, gdzie te dziedziny się spotykają. Z pewnością większe spotkanie i otwarcie między paleontologią a ewolucyjną biologią rozwoju spowodować może powstania bardziej racjonalnych i opartych na większym materiale dowodowym koncepcji i odrzucenie tych z pogranicza *fringe science* - jak gouldowski punktualizm i będący jego pierwowzorem saltacjonizm w stylu Schindewolfa.**

## Wprowadzenie

Wyjaśnienia procesów makroewolucji na gruncie mechanizmów rozwojowych oraz embriologii porównawczej współcześnie wydają się dość oczywiste. Wiążą się one chociażby z takimi koncepcjami jak modularność ewolucji czy *bricolage*. Nie zawsze jednak tak było. Koncepcja związku filogenezy z ontogenezą wywodzi się od Haeckela i Kowalewskiego. Temat został podjęty również przez d'Arcy Wentwortha Thompsona. Następnie na skutek czynników politycznych - oskarżenie o „prusactwo” i rzekomo wiążącą się z nim „intelektualną płaskość” - w 1915 roku została ona na wiele lat zarzucona; w tamtych czasach język prac naukowych był znacznie barw-

niejszy niż obecnie [12]. Rozwój organizmów żywych sugerowano badać niezależnie od ich ewolucji; takie stanowisko reprezentował między innymi Gavin de Beer. Spojrzenie na procesy rozwojowe pod kątem ewolucyjnym nastąpiło dopiero w latach pięćdziesiątych zeszłego stulecia za sprawą wielkich wysiłków Libbie Henrietty Hyman [12].

Obecnie ewolucyjna biologia rozwoju czerpie bardzo dużo z rozwoju genetyki rozwojowej i tłumaczenia procesów rozwoju organizmu na poziomie molekularnym [2, 9]. Dziedzina ta może pochwalić się szeregiem osiągnięć, jak wykazanie głębokiej homologii genów *Hox* u wszystkich zwierząt czy genów

naczelnych jak w przypadku Pax6, jak również wykazanie ekspresji genu *distal-less* w analogicznych tworach takich jak kończyny kręgowców, odnóża stawonogów i parapodia wieloszczetów. Za następne osiągnięcie należy uznać dowiedzenie homologii skrzela i skrzydła owadziego uzyskane dzięki porównaniu gradientów morfogenetycznych wewnątrz nich [12]. Wydaje się, że interpretacje tego typu wyników powinny być dość szeroko dyskutowane, jednakże odnieść można wrażenie, że *evo-devo* (jak się skrótowo określa tę dziedzinę nauki) zaczyna ulegać pewnej intelektualnej izolacji w obozie badania zjawisk makroewolucyjnych. Jako przykład należy tutaj wymienić sugerowaną głęboką homologię między układami nerwowymi pierwotnych - wieloszczeta *Platynereis dumerili* oraz muszki owocówki *Drosophila melanogaster*. Został popełniony tutaj oczywisty błąd wynikający z niedostrzeżenia dość elementarnego zoologicznego faktu w postaci metamerii heteronomicznej. Jednakże związki ewolucyjnej biologii rozwoju z innymi dziedzinami podejmującymi problem makroewolucji - jak filogenetyka molekularna, morfologia funkcjonalna i porównawcza oraz paleontologia - powinny wydawać się oczywiste.

Paleontologia - wyżej wymieniona - wydaje się podejściem bardzo zachowawczym. Jest to nauka powstała jeszcze w wieku XVIII - najpierw jako służebnica nauk geologicznych, następnie od XIX w. coraz mocniej zbliżająca się do nauk biologicznych, zoologii, botaniki i ewolucjonizmu [11,

12]. Wydawać się może, że paleontologia żyje w świecie swoich koncepcji. Faktycznie, wiele problemów tej dziedziny zaczyna się w czasach jeszcze przeddarwinowskich. Wtedy już powstawały pierwsze koncepcje mechanizmów ewolucji jak chociażby brokkizm [4, 12]. Na początku wieku XX temat ten był chętnie podejmowany przez szereg paleontologów - wymienić tutaj należy chociażby Othenio Abela czy Gustava Steinmanna - nie widzieli oni jednakże potrzeby poszukiwania wyjaśnień swoich koncepcji w oparciu o jakiekolwiek podstawy biologiczne [11, 12]. Dopiero Otton Schindewolf zaczął zastanawiać się nad problemem w sposób mechanistyczny - wyłożony on został w 1950 roku w jego *Grundfragen die Paläontologie* [11]. Jednakże późniejsze pokolenia paleontologów (jak chociażby Gould i Eldredge) [5, 6] postulowały w późniejszym okresie zjawiska, które ciężko jest wytłumaczyć na gruncie genetyki i embriologii. Wymienić tutaj należy chociażby koncepcję punktualistyczną, która do tej pory ma grupę zwolenników w środowisku paleontologicznym. Schindewolf, choć proponujący z gruntu błędne wyjaśnienia, odwołujące się do makromutacjonizmu Goldschmidta [11], na swój sposób wyprzedził epokę. Do tej pory bardzo niewielu paleontologów zajmując się często znacznymi przełomami w rozwoju życia organicznego rzadko odnosi swoje wyniki do ogólniejszej mechaniki ewolucji oraz do ich biologicznych podstaw. Można by tutaj argumentować *ad hominem*, że znaczna część z nich ma wykształcenie geologiczne



i wobec tego nie rozumie niuansów ewolucji; lecz pewnej zachowawczości środowiska nie da się wytłumaczyć względami czysto edukacyjnymi.

Odnieść można niezbite wrażenie, iż środowisko badań procesów makroewolucji staje się powoli wieżą Babel z coraz mniejszym przepływem informacji między poszczególnymi grupami, co jest poniekąd paradoksalne przy jednoczesnym zachwalaniu interdyscyplinarności. Zagadnienia stawiane przez paleontologów stanowią doskonały przykład do zastanowienia się nad nimi z punktu widzenia *evo-devo*, poniżej przedstawione zostanie kilka z nich.

Wybór będzie ograniczony do badań ewolucji zwierząt. Często stawianym zarzutem wobec ewolucyjnej biologii rozwoju jest jej zoocentryzm, ma to pewne uzasadnienie w ilości badań. Większość problemów paleontologicznych wywodzi się z paleozoologii, co ma z kolei uzasadnienie w jej większej ścisłości. W przypadku bowiem paleobotaniki funkcjonuje kilka równoległych systemów nazewnictwa odnoszących się do różnych części ciała danej kopalnej rośliny. Również strukturalne skamieniałości zwierząt są zdecydowanie bardziej dostępne niż szczątki roślin.

### **Zagadnienie punktualistycznej eksplozji**

W 1972 roku Gould i Eldredge opublikowali pracę, która wywołała nie małe poruszenie w świecie paleontologii [5, 6]. Zauważali oni mianowicie, że ewolucja nie musiała prze-

biegać gradualnie, lecz były długie okresy stagnacji a następnie dochodziło do eksplozji innowacyjności ewolucyjnej i powstawania całych nowych planów budowy, również do wzrostu liczby gatunków. Ich zdaniem ewolucja nie miała liniowego, gradualnego przebiegu tylko skokowy. Później Gould szukał różnych uzasadnień takiego a nie innego mechanizmu przemian makroewolucyjnych. Sugerował on również *a priori*, że jej mechanizmy były zgoła odmienne od mikroewolucyjnych, że istniały w dziejach Ziemi warunki sprzyjające wzrostowi ewolucyjnej innowacyjności. Wywodził on to później z przesłanek takich jak ewolucja z niewielkich grup i efekt założyciela, a następnie rozrost populacji. Daje się to wytłumaczyć na gruncie teorii koalescencji, mówiącej, że wszystkie allele obecne w danej puli muszą pochodzić z pojedynczego allelu. W ten sposób jednakże można analizować ewolucję pojedynczego gatunku i procesy filogeografii, a nie procesy megaewolucji, jak się do tego odnosiła ewolucyjna biologia rozwoju. Pojawiały się tutaj różne koncepcje. Jedna mówiła o buforowaniu przez białka HSP mutacji, a następnie nagłej eksplozji w przypadku zmniejszenia się ich wpływu [3]. Inne koncepcje odwoływały się do zmian w sekwencjach regulatorowych – enhancerów i silencerów [2]. Lecz mimo wszystko to nie tłumaczy powstania całych nowych planów budowy. Tutaj pojawia się zagadnienie duplikacji genów i to wielokrotnej, a następnie procesów neofunkcjonalizacji tychże genów, tak że powinny pełnić one inne funkcje niż

przedtem [8]. Pytanie tylko, czy może to nastąpić w czasie bardzo krótkim. Pytanie, co nazywamy zmianą punktualistyczną. Na przykład zanik lub zmniejszenie skrzydła u owada może odbyć się bardzo szybko, wystarczy się odwołać do genetyki *Drosophila melanogaster* oraz jej mutantów. W przypadku innych narządów nie musi to być wcale takie oczywiste. Punktualizm zatem sugeruje tutaj dziwny makromutacjonizm; zresztą można twierdzić, że Gould wywiódł całą tę koncepcję od Schindewolfa i nadał jej nowy wyraz. Schindewolf był bodaj jednym z nielicznych badaczy, którzy uznali, iż pierwszy ptak wylęgl się z gadziego jaja. Punktualizm nic tutaj nie mówi o żadnych pętlach regulacji, tylko wręcz a priori odwołuje się do makromutacjonizmu. Sam Gould zresztą wielokrotnie gubił się w swoich wywodach, uważając np., że najpierw powstał plan budowy danego typu, a następnie doszło do różnicowania na gatunki w jego obrębie [4, 5, 6].

Mógłby on mieć zastosowanie tylko w jednym wypadku. A mianowicie, kiedy genomy miałyby inną architekturę, a narządy nie były konstruowane modularnie z użyciem różnych genów. Gdyby konkretny gen odpowiadał za konkretny narząd w całości wystarczyłyby niewielkie jego mutacje, aby wykształcić inny narząd z niego, a następnie stosunkowo niewielka liczba mutacji, aby stworzyć nowy plan budowy. Jednakże, kiedy się spojrzy na rozwój zarodkowy, widoczne jest wielokrotne zastosowanie tych samych genów. Również w przypadku takiego

znacznego wybuchu przemian ewolucyjnych należałoby oczekiwać, że główne linie świata zwierząt będą się różnić pod względem genetycznym i rozwojowym. Jednakże grupa genów *Hox* występuje u wszystkich zwierząt tkankowych z wyjątkiem żebroplawów – te są prawdopodobnie izolowaną grupą świata zwierząt dającą się wyprowadzić jeszcze z ediakarańskich Rangeomorpha przez *Stromatoveris* [1]. Gdyby było tak, jak sądzi Gould i Eldredge, poszczególne główne linie Bilateria powinny się różnić pod tym względem – Lophotrochoza, Ecdysozoa, Deuterostomia i Acoelomorpha [12] miałyby inny układ głównych genów architektów.

Punktualizm rzadko doczeka się rzeczowej dyskusji. Wynika to po pierwsze z pewnego konserwatyzmu środowisk paleontologicznych chcących zapis kopalny interpretować literalnie, a nie w sposób syntetyczny i dynamiczny. Embriolodzy i genetycy również stosunkowo rzadko interesują się tego typu koncepcjami ewolucjonistycznymi. Jest jednakże pewien wyjątek, a o nim będzie niżej.

## **Eksplozja kambryjska**

W 1909 roku Charles Doolittle Walcott odkrył w przełęczu Burgess w Kolumbii Brytyjskiej niezwykle stanowisko zawierające skamieniałości zwierząt okresu kambryjskiego. Do tej pory przyciąga ono wielu paleontologów z całego świata, a renesans zaczął się wraz z Whittingtonem oraz jego wychowankiem, Conway Morrisem [6]. Spowodowało to również wykrystalizo-

wanie się pewnego mitu w środowiskach ewolucjonistycznych i paleontologicznych o kambryjskiej eksplozji mówiącego, że nagle wówczas wyłoniły się wszystkie plany budowy istniejących do tej pory zwierząt wielokomórkowych. Wiadomo, że tak wielka skala ewolucji pobudza wyobraźnię. Stanowiła ona paliwo dla Goulda lansującego odświeżony saltacjonizm w stylu Schindewolfa [4, 5].

Pojawiła się koncepcja, że wówczas doszło do zwiększenia się różnorodności genów *Hox*, prawdopodobnie na skutek znacznego ich zwielokrotnienia [8]. Z punktu widzenia procesów rozwojowych ma to sens, z obserwowanych danych paleontologicznych też wydaje się być poprawne – w przypadku literalnej interpretacji zapisu kopalnego. Natomiast kłania się tutaj genetyka ewolucyjna i filogenetyka molekularna. Wiele zegarów molekularnych przesuwają rozgraniczenie głównych linii świata zwierząt głęboko w eon prekambryjski, zatem te plany budowy miały czas się rozwinąć i to rzędu kilkuset milionów lat. Z punktu widzenia genetyki ewolucyjnej, jak wyobrazić sobie tak gwałtowną duplikację genów?

Musiało tutaj dojść do aberracji chromosomowych. Najprościej jest to wytłumaczyć znacznym zwielokrotnieniem całego genomu, a ten występuje w przypadku powstawania poliploidów. Te powstają często na skutek międzygatunkowej hybrydyzacji – takie zjawisko jest powszechnie notowane w świecie roślin, a rzadziej w świecie zwierząt (choć zdecydowanie rzadziej niż się często podaje się w literaturze

w zakresie zoologii systematycznej). Ilość garniturów chromosomów mogłaby ulec następnie zmniejszeniu na skutek działania efektu Hilla Robertsona [7]. Zatem musielibyśmy mieć hybrydyzację, lecz między czym konkretnie? Jak bardzo zróżnicowane były ówczesne zwierzęta? Tu musimy się zastanowić, czy mamy jednoznaczne ślady zwierząt w czasach wcześniejszych.

Niektórzy badacze jak Seilacher uważają organizmy okresu ediakarańskiego za wielkie pierwotniaki takie jak współczesne *Xenophyophora*, ślady geochemiczne gąbek również z okresu kriogeńskiego również nie jest trudno podważyć – mogły je zostawić inne organizmy eukariotyczne [10]. Zakładając zatem taki scenariusz, można przyjąć, że wczesne zwierzęta nie musiały być wcale bardzo zróżnicowane, mógł istnieć jeden pień, będący w zasadzie odpowiednikiem taksonu niewielkiej rangi. Tam mogłaby następować międzygatunkowa hybrydyzacja. Lecz czy to jest tak bardzo prawdopodobne? Prawdopodobnie nawet ówczesne zwierzęta były już na tyle zróżnicowane, iż nie mogły się ze sobą krzyżować, zatem wariant hybrydacyjny odpada – chyba że odwołać się do alternatywnej ewolucyjnej biologii rozwoju wyłożonej swego czasu przez Donalda Williamsona.

Co ciekawe, w świecie kambryjskim nie obserwujemy żadnych bardzo drobnych zwierząt. Brak tam płazińców, wielu typów związanych z meiofauną – jak wrotków, brzuchorzęsków, szczotkoryjkich, brakuje również wstężnic, nicieni. Mamy natomiast mięczaki, stawonogi, wiele niezmo-

gowców, pierścienice. Pokazywać to może, że one są pierwotne, natomiast wyżej wymieniane typy związane prze-  
ważnie z meiofauną powstały na skut-  
tek wtórnego uproszczenia. Wniosek  
ten zgadza się z hipotezą ekdyzonu,  
natomiast stanowi wyzwanie dla po-  
równawczej i ewolucyjnej biologii roz-  
woju. Jakie zmiany musiały nastąpić,  
aby doszło do tak radykalnego uprosz-  
czenia budowy – jak eliminacja układu  
krwionośnego oraz zanik jam ciała?  
Można sobie dzięki paleontologii wy-  
obrazić sekwencję zmian prowadzącą  
od pierwotnych niezmogowców do Xe-  
nusia, a następnie przez zwierzęta  
zbliżone do *Kerygmachela* – do stawo-  
nogów [12]. Lecz jak taką sekwencję  
zmian przeprowadzić w przypadku ni-  
cieni czy szczotkoryjkich? Następnie  
jak z pierścienicy wyprowadzić wstę-  
żnicę lub płazińca, jakie musiały nastą-  
pić zmiany w rozwoju? Wiele z tych  
zwierząt posiada larwy – na przykład  
wstężnice larwy Iwaty, Desora i pili-  
dium, a pierścienice trochoforę, u czę-  
ści wirków występują larwy Müllera.  
Czy one odegrały jakąkolwiek rolę  
w ewolucji tych zwierząt i zwierząt  
w ogóle [12], czy wskazywanie ich jako  
pierwotnych stadiów ewolucji ma jaki-  
kolwiek sens?

### **Larwalne teorie pochodzenia zwie- rząt - czy zwierzęta zaczęły się jako organizmy małe czy duże?**

Paleontolodzy lubią widzieć pierwotne  
zwierzęta jako organizmy co najmniej  
makroskopowe. Wiadomo, że pewien  
etap ewolucji zwierząt musiał się od-  
być w skali mikroskopowej, prawieło-

komórkowiec (*ur-metazoan*) nie musiał  
być wcale wielki, a różnić się on mógł  
niewiele od kolonii pierwotniaków.  
Lecz w historii zoologii porównawczej  
wystąpiło wiele koncepcji wywodzą-  
cych zwierzęta wielokomórkowe od  
istot zbliżonych do ich larw. Już w XIX  
w. zauważano podobieństwo między  
trochosferą a pelagicznym wrotkiem  
*Trochosphaera aequatoralis*. Później  
w końcu dwudziestego wieku duński  
zoolog Claus Nielsen zaproponował  
koncepcję trochei, wyprowadzał on  
główne wydarzenie w świecie zwierząt  
na poziomie pelagicznych larw [12].  
Z takim wyjaśnieniem nie zgadzała się  
większa część środowiska paleontolo-  
gicznego. Po pierwsze, dotyczy ono ra-  
czej bytów nie zachowujących się  
w stanie kopalnym, a zatem z ich  
punktu widzenia taka koncepcja nie  
jest w żaden sposób weryfikowalna. Po  
drugie, zarówno w kambrze jak i po-  
przedzającym go okresie ediakarań-  
skim obserwowano makroskopowe  
szczątki zwierząt, wobec czego można  
sądzić, że nawet jeśli były to okna tafo-  
nomiczne, to pierwotne zwierzęta mia-  
ły większe rozmiary ciała [6]. Tych  
małych lub bardzo małych zwierząt na-  
tomiast nie ma, zatem można sugero-  
wać, że nie istniały one  
w ówczesnym ekosystemie. Co może  
tutaj powiedzieć ewolucyjna biologia  
rozwoju?

Pozostaje przychylić się do stwierdze-  
nia paleontologów. Skąd się biorą lar-  
wy? Organizm ma pewne wyposażenie  
genetyczne, które pozwala wybudować  
taką larwę. Można to spokojnie tłuma-  
czyć w zakresie jego plastyczności,  
a ewolucyjnie – modyfikacja wcze-

nych procesów rozwojowych związane z wydarzeniami odbywającymi się jeszcze w trakcie oogenezy. Występowanie larw dotyczyły często grup dość ewolucyjnie zaawansowanych – przykładowo owady z przeobrażeniem zupełnym są bardziej zaawansowane niż te z przeobrażeniem niezupełnym. Jest to oczywiście pole dla ewolucyjnej biologii rozwoju – jak wyjaśnić, że zbliżone organizmy posiadają cykl rozwoju prosty i złożony.

## Podsumowanie

Ewolucyjna biologia rozwoju i paleontologia wydają się być dziedzinami, mówiąc kolokwialnie, z kompletnie innych światów [12]. Jednakże potrzeba zrekonstruowania wielkoskalowych procesów ewolucyjnych zbliża je bardzo mocno do siebie. Paleontologia dostarcza bowiem bezpośrednich dowodów ewolucji, a ewolucyjna biologia rozwoju umożliwia ich interpretację. Oczywiście, istnieją niesnaski między tymi dwoma obozami – wynikające chociażby z różnicy metodologii. Jednakże obecnie w poważnym problemie paleontologicznym ciężko nie znaleźć odwołań do procesów

rozwojowych. Sprawia to, że obydwie dyscypliny będą zmuszone być w większym stopniu otwarte na siebie. Zapobieże to tworzeniu koncepcji na pograniczu *fringe science* jak punktualizm czy saltacjonizm w wydaniu Schindewolfa [6, 11] – omawiany zresztą powyżej.

Część środowiska paleontologicznego, zwłaszcza zajmującego się wielkimi przemianami w świecie organicznym, jest gotowa na takie otwarcie. Dotyczy to na przykład problemu wyjścia kręgowców na ląd, który co prawda nie był wyżej omawiany, ale stanowi przykład kooperacji tych dwóch dziedzin nauki. Innym przykładem jest wyjaśnienie ewolucji czaszki i uzębienia.

Z drugiej strony pamiętać trzeba o tworzeniu takich koncepcji, które mają racjonalne założenia. Wyżej omawiano zagadnienie eksplozji kambryjskiej będącej wielkim polem działań zarówno przedstawicieli *evo-devo* jak i paleontologów. Lecz wiele z tych koncepcji pozbawionych jest rozsądnych założeń, co pozwala je uznać za mało wiarygodne. Wychodzą one z obydwu tych środowisk i wynikają, mimo wszystko, z ich zachowawczości i hermetyzmu.

## Bibliografia:

[1] Antcliffe J. B. i wsp., *Charnia* and sea pens are poles apart, *Journal of Geological Society*, 2006, 164, 49-51.  
[2] Carrol S. B., *Evo-devo and expanding evolutionary synthesis: a genetic theory of morphological evolution*, *Cell*, 2008, 134(1), 25-36.  
[3] Erwin D. G., *Macroevolution is more than repeated rounds of microevolution*, *Evolution &*

*Development*, 2000, 2(2), 78-84.

[4] Gould S. J., *Eternal metaphors in paleontology*, [w:] red Hallam A., *Patterns of evolution as illustrated by the fossil record: developments in paleontology and stratigraphy*, Elsevier Scientific Publishing Company, 1977.

[5] Gould S. J., *Niewczesny pogrzeb Darwina*, Wyd. Prószyński i S-ka, Warszawa, 1999.

[6] Gould S. J., *Wonderful Life*, W. W. Norton &

CO, New York, 1989.

[7] Harti D. L., Clark A. G., Principles of population genetics, 4th ed, Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland, Massachusetts, 2007.

[8] Holland P. W. H., Did homeobox gene duplications contribute to the Cambrian explosion, *Zoological Letters*, 2015, 1(1), 1-8.

[9] Müller G., i wsp., Origination of organismal form: beyond gene and development, MIT Press,

Cambridge, 2003.

[10] Seilacher A. i wsp., Morphodynamics. CRC Press, 2014.

[11] Schindewolf O., Basic questions in paleontology. Geologic time, organic evolution and biological systematics, University of Chicago Press, 1993.

[12] Urbanek A., Jedno istnieje tylko zwierzę, Wyd. Muzeum i Instytut Zoologii PAN, Warszawa, 2007.



# Alternatywne źródła serc do przeszczepów

Anna Jędrzejak

Sekcja Medycyny Regeneracyjnej i Badań nad Nowotworami

Koło Naukowe Przyrodników

Wydział Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

ann.jedrzejak@gmail.com

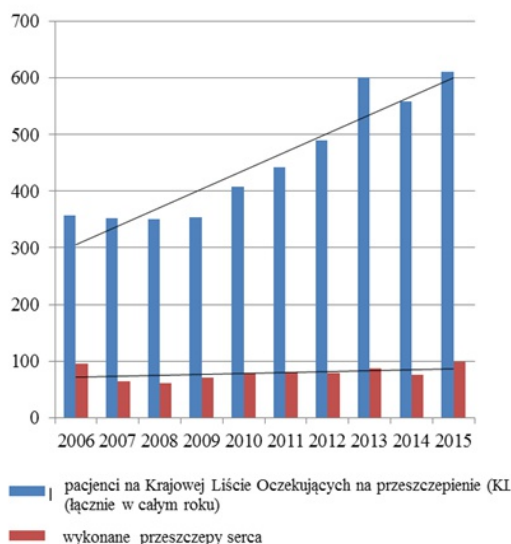
Praca napisana pod opieką dr Katarzyny Kluzek

**Aktualnie przeszczep serca jest standardowym postępowaniem w przypadku schyłkowej niewydolności tego organu. Największym ograniczeniem jest w tym momencie niewystarczająca liczba dawców - w Polsce ilość przeszczepów serca wykonywanych każdego roku oscyluje w okolicach 80 i jest średnio 5 razy niższa niż zapotrzebowanie na ten narząd, analogiczna sytuacja ma miejsce na całym świecie. Z racji stałego deficytu dawców prowadzone są intensywne badania nad alternatywnymi źródłami serc do przeszczepów - ksenotransplantacjami, hodowlami narządowymi oraz mechanicznymi sercami. Artykuł zawiera krótki opis każdej z tych metod, ze zwróceniem uwagi na najważniejsze kwestie pozostające do rozwiązania, zanim uzyskane w ten sposób serca będą mogły stanowić uzupełnienie dla tych pochodzących od zmarłych dawców. Żadna z omówionych technik nie jest na razie stosowana w praktyce medycznej, wszystkie są w fazie badań - na zwierzętach lub klinicznych. W efekcie nie są znane długofalowe konsekwencje transplantacji takiego serca dla organizmu człowieka.**

W 1967 r. dr Christian Barnard przeprowadził pierwszy przeszczep serca. Od tego czasu pojawiło się wiele kontrowersji związanych z zabiegiem, zarówno natury naukowej, technicznej, jak i etycznej, jednak większość z nich została w znacznym stopniu przezwyciężona. W efekcie, aktualnie przeszczep serca jest standardowym postępowaniem w przypadku schyłkowej niewydolności tego organu. Obecnie największą przeszkodą występującą przy stosowaniu tej metody jest niewystarczająca ilość dawców. Zgodnie z danymi pochodzącymi z Poltransplantu [1-10] (organizacji zajmującej się koordynacją przeszczepów na terenie Polski) liczba osób oczekujących na transplantację serca wpisanych na

Krajową Listę Oczekujących (KLO) (liczona jako liczba osób, które zostały na listę wpisane, niezależnie od ich dalszego losu i czasu przebywania na liście) wzrasta co roku. Jednocześnie liczba dostępnych serc, a więc także samych przeszczepów oscyluje wokół zbliżonych wartości (ryc. 1) i jest około 4-6 razy niższa od zapotrzebowania. Analogiczna sytuacja ma miejsce na całym świecie - w Stanach Zjednoczonych wykonuje się rocznie około 2500 przeszczepów serca, a mimo to ilość potrzebnych serc przewyższa tę liczbę ponad 100 krotnie [11].

Z racji stałego i poważnego deficytu, wiadomym jest, że nie wszystkie osoby potrzebujące przeszczepu będą mogły go otrzymać. W związku z tym utwo-



**Ryc. 1.** Przeszczepy serc w Polsce w latach 2006-2015. [1-10]. Niebieskie słupki odnoszą się do ilości pacjentów oczekujących na przeszczep serca wpisanych na KLO (liczba osób, które w danym roku figurowały na KLO, niezależnie od ich dalszego losu oraz czasu przebywania a liście). Czarne linie obrazują trend, pokazując szybki wzrost zapotrzebowania na serca i jedynie nieznaczny wzrost dostępnych serc.

rzono Krajową Listę Oczekujących na przeszczep, która kategoryzuje i priorytetyzuje przypadki na podstawie określonych kryteriów, zależnych od stanu chorego. Ich spełnienie przekłada się na większą ilość punktów, które odpowiadają wyższej pozycji na KLO, a tym samym wyższemu priorytetowi przeszczepu. Wobec tego, zapotrzebowanie na serca możemy podzielić na przypadki pilne (w trybie „urgens”), w sytuacji, gdy występuje ciężka niewydolność serca, inne terapie nie przynoszą skutków, a stan pacjenta się pogarsza, oraz przypadki mniej pilne

(w trybie planowym), kiedy pacjent jest stabilny krążeniowo i może być leczony zachowawczo. Istnieje jednak grupa pacjentów, którzy na listę się nie dostaną oraz takich, którzy będą się na niej plasować stosunkowo nisko. Mimo umieszczenia ich na KLO, realna szansa takich pacjentów na otrzymanie przeszczepu jest bliska zeru.

W obliczu niedoboru serc do przeszczepu rozwijane są alternatywne rozwiązania mające na celu zwiększenie ilości dostępnych serc i uratowanie życia pacjentom ze schyłkową niewydolnością tego narządu. Możemy wyróżnić trzy główne podejścia – ksenotransplantację, hodowlę narządową oraz tworzenie mechanicznych urządzeń zastępujących serca.

## Ksenotransplantacje

Ksenotransplantacją nazywa się przeszczepienie komórek, tkanek lub narządów pomiędzy osobnikami dwóch różnych gatunków. Początkowo duże nadzieje wiązano z szympanсами i pawianami, jako naczelnymi bliskimi człowiekowi, z czasem jednak zwrócono się w kierunku świń, jako że są one łatwo dostępne i tanie w hodowli, również w warunkach wolnych od patogenów. Ponadto rodzą stosunkowo dużo młodych, które szybko osiągają dojrzałość, a w dodatku ich organy wewnętrzne są zbliżone rozmiarami do ludzkich [12]. Z ksenotransplantacjami wiążą się jednak dwie główne obawy: (a) odrzucenie przeszczepu spowodowane specyficznymi gatunkowo różnicami występującymi pomiędzy dawcą a biorcą oraz (b) ryzyko przeniesienia

patogenów odzwierzęcych.

Jednym z najsilniej immunogennych dla człowieka antygenów świńskich jest  $\alpha$ -1,3-galaktoza ( $\alpha$ -1,3-gal), która potrafi spowodować nadostre odrzucenie narządu w zaledwie kilka minut po transplantacji [13].  $\alpha$ -1,3-gal jest cząsteczką cukru należącą do węglowodanów tworzących glikokaliks. Nie występuje ona na powierzchni komórek ludzkich, w związku z czym komórka, na której powierzchni zostanie wykryta, zostaje przez nasz organizm zniszczona. Można temu zapobiec poprzez unieczynnienie (*knockout*) genu kodującego  $\alpha$ -1,3-galaktozylotransferazę, która uczestniczy w procesie biosyntezy  $\alpha$ -1,3-gal. Okazuje się jednak, że tylko spowalnia to proces odrzucenia, ale go nie eliminuje, co wskazuje na uczestnictwo większej ilości antygenów w tym procesie [12-14].

Drugą budzącą kontrowersje kwestią jest potencjalna możliwość przeniesienia razem z przeszczepem patogenów odzwierzęcych, szczególnie retrowirusów, które mają zdolność do integracji z genomem zainfekowanej komórki i mogą być przekazywane z pokolenia na pokolenie. Oznacza to, że nawet zdrowe świnię, hodowaną w wolnych od patogenów warunkach, posiadającą w swoim genomie wirusowe DNA. Do tej pory przeniesienie wirusów nie zostało zademonstrowane *in vivo* [12], jednak teoretycznie jest to możliwe. Jeśli taki wirus okaże się wirulentny w komórkach ludzkich (zdolny do namnożenia się i wywołania objawów chorobowych), może szybko dojść do epidemii, ponieważ nasz organizm nie miał jeszcze możliwości nabycia na

niego odporności.

Oba problemy próbuje się aktualnie rozwiązać przy zastosowaniu systemu pozwalającego na szybką i precyzyjną edycję genomu – CRISPR/Cas9. W przypadku zapobiegania odrzuceniu polega to: (a) na wyłączaniu ekspresji kolejnych antygenów wywołujących odpowiedź ze strony ludzkiego układu immunologicznego i (b) na wprowadzaniu ludzkich białek analogicznych do usuniętych świńskich białek, a także białek o działaniu np. przeciwzapalnym [12]. System ten może również posłużyć do unieszkodliwiania wirusowego DNA zlokalizowanego w obrębie genomu świńskiej komórki [12, 13].

Niewykluczone jednak, że po pokonaniu tych wstępnych trudności, świńskie narządy okażą się być niedostosowane do potrzeb ludzkiego organizmu. Nie wiadomo, czy będą one reagowały na ludzkie hormony, pozwalając na utrzymanie homeostazy organizmu, ani czy będą miały wystarczającą „trwałość”, jako że czas życia świni jest znacznie krótszy niż czas życia człowieka.

### **Hodowle narządowe na matrycach naturalnych**

Narządy składają się z komórek oraz macierzy zewnątrzkomórkowej (ang. *extracellular matrix*, ECM). Komórki są odpowiedzialne za funkcjonowanie organu, w przypadku serca – za kurczenie się przedsionków i komór. ECM jest natomiast strukturą białkową, w której skład wchodzi między innymi kolageny, lamininy, elastyna, fibronektyna i proteoglikany [15, 16]. Pełni ona

funkcję swego rodzaju podpory strukturalnej, rusztowania (ang. *scaffold*) dla komórek, zapewniając odpowiedni kształt i mechaniczną stabilność tkanki. Dodatkowo taki szkielet jest rezerwuarem czynników wzrostu, a jego interakcje z komórkami wpływają na ich proliferację, migrację, adhezję i różnicowanie się [15, 16]. Pozbawiona komórek ECM nie jest w stanie samodzielnie pełnić funkcji danego organu, ale jej zachowana (łącznie z naczyniami włosowatymi) struktura pozwala na stosunkowo łatwą introdukcję nowych komórek.

Na tym założeniu opiera się technika nazywana decelularyzacją (ang. *decellularization*). Pierwszy etap polega na rozpuszczeniu i usunięciu wszystkich komórek. Może to zostać osiągnięte przy użyciu czynników chemicznych, biologicznych oraz mechanicznych, lub ich połączeń. Wśród czynników chemicznych możemy wymienić kwasy (np. kwas octowy), zasady (np. wodorotlenek wapnia, siarczek sodu, wodorotlenek sodu), roztwory hipotoniczne i hipertoniczne, detergenty (np. Triton-X100, SDS, CHAPS) oraz rozpuszczalniki (alkohole, aceton, TBP). Do czynników biologicznych należą enzymy (np. nukleazy, kolagenazy, lipazy, dyspazy, termolizyny, tripsyna) oraz czynniki chelatujące (np. EDTA, EGTA). W przypadku czynników mechanicznych wyróżnia się temperaturę, nacisk i ciśnienie. Wybór procedury decelularyzacji zależy od cech tkanki – jej grubości, ilości komórek oraz ich gęstości [17].

Efektom decelularyzacji jest białoprzezroczysta białkowa struktura, czyli

właśnie ECM. Potem następuje recelularyzacja (ang. *recellularization*) – wprowadzane są komórki macierzyste (na stopniu rozwoju zależnym od konkretnej procedury), które zasiedlają macierz i zaczynają się różnicować. Jednak niezależnie od czynników wzrostu zawartych w macierzy lub podawanych z zewnątrz, organ musi się rozwijać w inkubatorze imitującym warunki ludzkiego organizmu. Dla serca będą to: (a) impulsy elektryczne imitujące naturalną impulsację zmuszającą mięśnie serca do skurczu, (b) mechaniczny nacisk na ściany serca, w normalnych warunkach powodowany ciśnieniem przepływającej krwi, tu – płynnych substancji odżywczych, (c) odpowiednie stężenie tlenu i dwutlenku węgla, (d) fizjologiczne pH, (e) temperatura.

Szczególne zainteresowanie decelularyzacją wynika z założenia, że macierz zewnątrzkomórkowa sama w sobie nie powinna być immunogenna, jako że za wywoływanie odpowiedzi immunologicznej mają odpowiadać komórkowe komponenty organu [17]. Potencjalnie możliwe jest więc wykorzystanie matryks pochodzących z serc zwierzęcych, np. świńskich. Jednak przeprowadzone dotąd badania [18] nie pozwalają na wyciągnięcie jednoznacznych i pewnych wniosków na ten temat. Dodatkową zaletą decelularyzacji jest fakt, że komórki macierzyste zasiedlające ECM mogą być komórkami przyszłego biorcy (np. indukowane pluripotentne komórki macierzyste – ang. *Induced Pluripotent Stem Cells*, iPSC), co zmniejsza ryzyko odrzucenia przeszczepu oraz konieczność przyj-

mowania leków immunosupresyjnych. Należy jednak wziąć pod uwagę podłoże choroby serca – jeśli jest ono genetyczne, to użycie komórek własnych biorcy prawdopodobnie szybko spowoduje niewydolność nowego serca.

Do rozwiązania pozostaje kwestia opracowania metod decelularyzacji, ponieważ te aktualnie dostępne w pewnym stopniu uszkodzają macierz zewnątrzkomórkową. Jak dotąd nieznaną jest procedura, która nie zmieniała by właściwości ECM, co oznacza, że naukowcy zmuszeni są dążyć do kompromisu pomiędzy wysokim odsetkiem usuniętych komórek (brak immunogenności) a brakiem uszkodzenia macierzy [17]. Takie uszkodzenie ECM może wpływać nie tylko na trudności w różnicowaniu się komórek, ale także na obniżenie mechanicznej wydolności organu, co jest szczególnie istotne dla serca. Jest to prawdopodobnie jeden z powodów, dla których nie udało się do tej pory wyhodować serca spełniającego warunki niezbędne do utrzymania organizmu człowieka przy życiu.

### **Hodowle narządowe na matrycach syntetycznych**

Druk trójwymiarowy (druk 3D, ang. *3D printing*, *3D bioprinting*) daje możliwość wytworzenia tkanek lub narządów przy użyciu „tuszu” składającego się z komórek i materiału mającego imitować naturalną ECM do czasu, aż komórki się namnożą i zaczną same wydzielać składniki macierzy do środowiska. Jednak uzyskanie takiego tworzywa jest bardzo trudnym zadaniem, jako że macierz zewnątrzkomórkowa

charakteryzuje się szeregiem ważnych parametrów, z których każdy w specyficzny sposób wpływa na zachowanie komórek. Zostały one szczegółowo opisane w innym miejscu [16].

Syntetyczny *scaffold*, a więc zarazem i surowiec, z którego zostanie on wykonany, musi spełniać liczne warunki: musi być biokompatybilny i cytokompatybilny, biodegradowalny, nietoksyczny, dostosowany mechanicznie do tkanki, którą ma imitować i precyzyjnie wydrukowany (w dużej rozdzielczości). Dodatkowo musi umożliwiać wzrost, proliferację, migrację oraz przywieranie komórek. Substancja taka powinna cechować się niską lepkością, gdyż komórki lepiej rosną w środowisku, które nie wywiera na nie zbyt dużego naporu. Bardzo ważne dla wzrostu komórek są też parametry takie jak wielkość, objętość i kształt porów w wydrukowanym rusztowaniu oraz połączenia między nimi, które ułatwiają przepływ składników odżywczych i tlenu pomiędzy komórkami, odprowadzanie zbędnych produktów metabolizmu oraz migrację komórek [19–21].

Wśród materiałów wykorzystywanych do drukowania 3D figurują: (a) metale (np. żelazo, kobalt, chrom, stal nierdzewna oraz stopy tytanu), (b) materiały ceramiczne (np. hydroksyapatyt, trójfosforan wapnia (TCP), krzemian wapnia), (c) polimery (np. hydrożele takie jak żelatyna, chitozan, alginiany, kwas hialuronowy) oraz (d) materiały kompozytowe (np. fosforan wapnia + kolagen typu I, materiały ceramiczne + hydrożele) [20].

Aktualny stan wiedzy pozwala między



innymi na druk zastawek serca, które jednak nie posiadają mechanicznej wytrzymałości i elastyczności niezbędnej dla funkcjonowania *in vivo* [19]. Prowadzone są też hodowle funkcjonalnej tkanki mięśniowej *ex vivo* (ang. *Cardiac Tissue Engineering*, CTE) z wykorzystaniem „tuszu” składającego się z materiału imitującego naturalną macierz zewnątrzkomórkową oraz progenitorów kardiomiocytów (ang. *human cardiac derived cardiomyocyte progenitor cells*, hCMPCs) o częściowym zróżnicowaniu w kierunku linii komórek serca [21]. Mimo to, nadal nie ma możliwości wydrukowania serca jako całego narządu.

Do zalet druku 3D można zaliczyć dużą kontrolę nad kształtem i rozmiarem wytworzonej tkanki oraz nad rozmieszczeniem komórek w obrębie scaffoldu [20, 21]. Natomiast kwestie, które najbardziej ograniczają rozwój tej metody, to przede wszystkim brak „tuszy” o wymaganych właściwościach [19], niewystarczająca rozdzielczość urządzeń drukujących oraz grubość tkanki możliwej do uzyskania (grubsza tkanka wymaga naczyń krwionośnych dostarczających tlen i substancje odżywcze) [21].

### **Mechaniczne serca - *Total Artificial Heart* (TAH)**

Mechaniczne urządzenia wspierające krążenie możemy podzielić na takie, które odciążają naturalne serce oraz takie, które całkowicie je zastępują, przejmując funkcję utrzymywania przepływu krwi. Do tych pierwszych zaliczają się maszyny wspomagające

lewą komorę serca (ang. *Left Ventricular Assist Device*, LVAD), prawą komorę serca (ang. *Right Ventricular Assist Device*, RVAD), albo obie komory na raz (ang. *Biventricular Assist Device*, BiVAD). Aparaty te są zwykle podłączane bez usuwania części biologicznego serca, w celu poprawy i ustabilizowania stanu pacjenta do czasu przeszczepu (ang. *bridge to transplant*) [22]. Zdarzają się przypadki, w których takie urządzenie na tyle przejmuje krążenie, że naturalne serce ma szansę się zregenerować i przeszczep przestaje być potrzebny. Maszyny całkowicie zastępujące serce nazywane są sztucznymi sercami (ang. *Total Artificial Heart*, TAH). Wśród nich znajdziemy dwa szczególnie ciekawe przypadki - serce SynCardia (dawniej Jarvik7 i CardioWest) oraz Carmat.

SynCardia to pierwsze urządzenie typu TAH zaakceptowane do użytku komercyjnego jako „*bridge to transplant*” przez amerykańską organizację Food and Drug Administration (FDA), jej kanadyjski odpowiednik - Health Canada oraz przez Komisję Europejską [22, 23]. Dodatkowo serce zostało również zaaprobowane w ramach Humanitarian Use Device jako tzw. „*destination therapy*”, czyli terapia docelowa dla pacjentów, którzy nie kwalifikują się do przeszczepu i nie mieliby szansy go otrzymać [24]. Przenośna jednostka zasilająca pozwala pacjentowi na wyjście ze szpitala i powrót do domu oraz wykonywanie przynajmniej części codziennych czynności, co było niemożliwe dla osoby ze schyłkową niewydolnością serca.



Serce Carmat jest natomiast stworzone z myślą o całkowitym i trwałym zastąpieniu naturalnego serca. Jest najbardziej zaawansowanym technicznie sztucznym sercem – całkowicie wszczepiane do klatki piersiowej, bez żadnych rurek ani przewodów przerywających ciągłość powłok skórnych. Wnętrze, mające bezpośredni kontakt z krwią, jest pokryte warstwą tkanki zwierzęcej, co znacząco zwiększa hemokompatybilność. Serce jest zasilane przy pomocy przezskórnej transmisji energii (ang. *Transcutaneous Energy Transfer*, TET) przez baterię o żywotności do 12 godzin lub jednostkę zasilającą. Duża liczba czujników i odpowiednie algorytmy pozwalają na kontrolę obciążenia wstępnego i następczego serca oraz ciśnienia w naczyniach krwionośnych, a także na dostosowanie szybkości przepływu krwi do tych parametrów. Oznacza to, że serce zaadaptuje się do potrzeb organizmu, a pacjent będzie mógł wykonywać nie tylko najbardziej podstawowe czynności, ale również takie wymagające większego przepływu krwi – np. trucht czy jazda na rowerze. Głównym problemem jest wielkość i waga urządzenia – według przewidywań firmy pasuje ono do 65% pacjentów, w tym 86% mężczyzn, ale już tylko 14% kobiet [23, 25].

## Podsumowanie

Wobec stałego i zwiększającego się deficytu dawców serc, ważne jest poszukiwanie alternatywnych źródeł tego narządu lub sposobów na zastąpienie go. Do takich technik można zaliczyć:

(a) ksenotransplantacje, polegające na przeszczepianiu zmodyfikowanych genetycznie świńskich narządów, (b) hodowle narządowe na matrycach naturalnych, których celem jest otrzymanie macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM) pozbawionej komórek, a następnie zasiedlenie jej własnymi komórkami biorcy i utworzenie funkcjonalnego narządu, (c) hodowle na matrycach syntetycznych, polegające przede wszystkim na technice druku 3D oraz jego wykorzystaniu do sporządzenia precyzyjnych, trójwymiarowych struktur zastępujących narządy i (d) konstruowanie mechanicznych serc, zwłaszcza typu *Total Artificial Heart* (TAH) – maszyn całkowicie przejmujących funkcję serca.

Najczęściej występujące problemy to brak hemokompatybilności, częste infekcje około i pooperacyjne, immunogenność materiałów użytych do produkcji, zbyt mała wytrzymałość mechaniczna wytworzonych serc oraz niewystarczająca dokładność metod, nie pozwalająca na odtworzenie szczegółów budowy tego organu.

Żadna z opisanych w artykule procedur nie jest na razie stosowana w praktyce medycznej jako alternatywa dla przeszczepu serca – wszystkie one są w fazie badań – na zwierzętach lub klinicznych. Najdalej posunięte są badania nad sztucznym sercem firmy SynCardia, która jako jedyna posiada zgodę FDA na wykorzystanie swoich urządzeń w formie „*bridge to transplant*” lub terapii docelowej dla osób, które nie kwalifikują się do przeszczepu (często w podeszłym wieku). W związku z powyższymi nie są znane

długofalowe konsekwencje zastąpienia niewydolnego serca sercem stworzo-

nych przy użyciu omówionych metod.

## **Bibliografia:**

- [1] Biuletyn Poltransplantu 2007.
- [2] Biuletyn Poltransplantu 2008.
- [3] Biuletyn Poltransplantu 2009.
- [4] Biuletyn Poltransplantu 2010.
- [5] Biuletyn Poltransplantu 2011.
- [6] Biuletyn Poltransplantu 2012.
- [7] Biuletyn Poltransplantu 2013.
- [8] Biuletyn Poltransplantu 2014.
- [9] Biuletyn Poltransplantu 2015.
- [10] Biuletyn Poltransplantu 2016.
- [11] Halushka M. K. i wsp., Heart failure therapies: new strategies for old treatments and new treatments for old strategies, *Cardiovasc Pathol*, 2016, 25, 503-11.
- [12] Editorial, Xenotransplantation 2.0, *Nat Biotechnol*, 2016, 34(1), 1.
- [13] Reardon S., New life for pig organs, *Nature*, 2015, 527, 152-4.
- [14] Byrne G. W. i wsp., Cardiac xenotransplantation: Progress and challenges, *Curr Opin Organ Transplant*, 2013, 17(2), 148-54.
- [15] Theocharis A. D. i wsp., Extracellular matrix structure, *Adv Drug Deliv Rev*, 2016, 97, 4-27.
- [16] Akhmanova M. i wsp., Physical, spatial, and molecular aspects of extracellular matrix of in vivo niches and artificial scaffolds relevant to stem cells research, *Stem Cells Int*, 2015, 2015, 167025.
- [17] Crapo P. M. i wsp., An overview of tissue and whole organ decellularization processes, *Biomaterials*, 2011, 32(12), 3233-43.
- [18] Wong M. L. i wsp., Immunogenicity in xenogeneic scaffold generation: Antigen removal versus decellularization, *Acta Biomater*, 2008, 10(5), 1806-16.
- [19] Li J. i wsp., Recent advances in bioprinting techniques: approaches, applications and future prospects, *J Transl Med*, 2016, 14, 271, 1-15.
- [20] Do A. i wsp., 3D printing of scaffolds for tissue regeneration applications, *Adv Heal Mater*, 2015, 4(12), 1742-62.
- [21] Gaetani R. i wsp., Cardiac tissue engineering using tissue printing technology and human cardiac progenitor cells, *Biomaterials*, 2012, 33(6), 1782-90.
- [22] Cook J. A. i wsp., The total artificial heart, *J Thorac Dis*, 2015, 7(12), 2172-80.
- [23] Fox C. S. i wsp., Total artificial hearts - Past, current, and future, *J Card Surg*, 2015, 30(11), 856-64.
- [24] Spiliopoulos S. i wsp., A first step beyond traditional boundaries: Destination therapy with the SynCardia total artificial heart, *Interact Cardiovasc Thorac Surg*, 2014, 18(6), 855-6.
- [25] Mohacsi P. i wsp., The CARMAT total artificial heart, *Eur J Cardio-thoracic Surg*, 2014, 46(6), 933-4.

# Selekcjonizm genów Dawkinsa cztery dekady później

Edwin Sieredziński  
colonelvolf@gmail.com

**Richard Dawkins jest intelektualistą budzącym wiele kontrowersji. O ile w ostatnich czasach wywołuje je jako radykalny ateista, o tyle wcześniej wywołał niemałe dyskusje w dziedzinie biologii ewolucyjnej. Selekcjonizm genów Dawkinsa zapoczątkował wiele kontrowersji ciągnących się po dziś dzień. Należy się jednakże zastanowić, czy w obecnych czasach wobec postępu licznych nauk biologicznych - a koncepcja jest dosyć szeroka i dotyczy wielu działów biologii - czy nie trąci ona myszką. Przede wszystkim czy gen może być uważany za jednostkę dyskretną - a taki warunek musi spełniać jednostka doboru naturalnego, czy adaptacjonizm będący jednym z podstawowych założeń nie stał się anachroniczny oraz jaki jest związek koncepcji Dawkinsa z biogenezą - musiało to bowiem wszystko mieć swój początek. Można uznać, że Dawkins wpłynął w sposób znaczny na sposób myślenia oraz obrania ścieżki zawodowej wielu przyrodników, lecz może jego koncepcja samolubnego genu może być rozważana w zbliżony sposób do uniwersalnej gramatyki Chomsky'ego jako bardzo wpływowy pogląd nie znajdujący jednak obecnie potwierdzenia w empirycznej rzeczywistości.**

## Wprowadzenie

Richarda Dawkinsa nikomu przedstawiać nie trzeba. Ma opinię jednego z najbardziej wpływowych intelektualistów świata, nazywany jest niejednokrotnie bulterierem Darwina z racji swojej bezkompromisowej obrony myśli ewolucyjnej przed zakusami różnych szarlatanów. Dla wielu młodych przyrodników jest on wręcz guru, a jego teksty dotyczące ewolucjonizmu są czytane na zajęciach z tego przedmiotu na szeregu uczelni. Obecnie jest jednakże bardziej znany ze swojego antyteizmu - z racji publikacji *Boga urojonego*. Dla części osób nie związanych z naukami o życiu nazwisko Daw-

kinsa będzie prędzej kojarzone z tą książką aniżeli z szeregiem książek napisanych przezeń w latach 70. i 80. zeszłego stulecia. Wyklada w nich dość kontrowersyjną koncepcję selekcjonizmu genów [8, 10, 11]. Przez część środowiska biologów została ona przyjęta jako dość dobrze tłumacząca rzeczywistość. Warto się jednakże przyjrzeć jej założeniom.

Dawkins w zasadzie tam podaje skrajną wersję neodarwinizmu, w której organizm zostaje zdegradowany li tylko do nośnika genów, natomiast prawdziwym podmiotem ewolucji stają się geny. Koncepcja ta ma korzenie już

u Weissmana, niemieckiego prekursora neodarwinizmu z końca wieku XIX, co sam Dawkins przyznaje [3-6]. Powstała ona również nie na gruncie genetyki czy biologii molekularnej, co występuje w mniemaniu młodych adeptów nauk biologicznych, lecz na bazie ekologii ewolucyjnej oraz neodarwinizmu [3, 4, 11]. W latach sześćdziesiątych odrzucono ostatecznie dobór grupowy i dobór gatunków, nastąpiło to wraz z koncepcją dostowania włącznego Hamiltona – opublikowaną w 1964 roku. Na niej również bazowała synteza Wilsona opublikowana w 1975 roku – słynna socjobiologia. Biologia ewolucyjna skierowała się wówczas na poziom skali mikro- jak na standardy tej dziedziny i wytłumaczenie szeregu zachowań zwierząt [1, 3, 11]. Jednakże Dawkins stworzył koncepcję o wiele bardziej wszechogarniającą i znacznie bardziej całościową niż tłumaczenie altruizmu osobniczego oraz oddziaływania osobników między sobą [4]. Wiąże się ona z szeregiem założeń, które w obecnych czasach stają się co najmniej kłopotliwe. Pewne można było przyjmować w latach siedemdziesiątych, kiedy zarówno molekularna biologia rozwoju jak i neurobiologia były mocno w powijkach [11, 12], jak również szereg innych dziedzin ewolucjonizmu – chociażby poglądy na temat biogenezy [2, 3]. Sam Dawkins zdaje sobie z tego doskonale sprawę, no i nawet czyni pewne próby pokazania swojej koncepcji w szerszej perspektywie ewolucyjnej. W obecnych czasach również pojęcie genu – uchodzące bardzo często za pierwotne – staje się dość kłopo-

tliwe. Jak wyobrażać sobie selekcję bytu, który jest ciężko jednoznacznie zdefiniować.

Tymi problemom poświęcony będzie niniejszy tekst. Selekcjonizm genów Dawkinsa jest dość wygodny z punktu widzenia niektórych dziedzin – jak np. ekologii ewolucyjnej, ponieważ pozwala on na darwinowską analizę ewolucji zachowań bez zważania na wiele dodatkowych czynników, chociażby plastyczność osobników [1, 3, 4]. W tym wypadku nie uwzględnia on roli złożoności organizmów – przykładowo kos dostosowujący się do życia w środowisku miejskim nie potrzebuje żadnych zmian genetycznych, podobnie jest w przypadku ptaków krukowatych, zatem mówienie o zmianach mikroewolucyjnych jest w tym wypadku pewnym nadużyciem. Tego typu rozumowanie zawładnęło również wyobraźnią części badaczy na pograniczu nauk społecznych i biologicznych – mowa tutaj o antropologii biologicznej, psychologii ewolucyjnej czy ekologii behawioralnej człowieka [10-13]. Z tego powodu warto je dyskutować w sposób krytyczny.

### **Dobór jednostek dyskretnych – czym jest gen w koncepcji Dawkinsa?**

Dawkins w swoich pracach dzieli głównych aktorów na ewolucyjnej scenie na dwie grupy. Z jednej strony mamy nośniki – są to organizmy (również my), służące jako maszyny przetrwania genów. Są one tylko podmiotem przemian ewolucyjnych. Później jest właściwy podmiot – tj. replikatory, czy-

li właściwy przedmiot działań ewolucji, materiał genetyczny w organizmach, przenoszony wraz z linią płciową z pokolenia na pokolenie [3, 4]. W latach 70. wszystko było względnie proste, ponieważ wówczas istniał tylko centralny dogmat biologii molekularnej – droga od DNA przez RNA do białka. Obecnie wiadomo, że to jest znacznie bardziej złożony proces z licznymi pętlami sprzężeń zwrotnych. Krytycy jednakże już wtedy zwrócili uwagę na fakt bardzo kłopotliwy dla całej koncepcji Dawkinsa: a czymże dla niego jest gen? [4, 7]

Zauważyć można, że funkcjonuje obecnie szereg definicji genu. W genetyce mendlowskiej jest to fragment materiału genetycznego odpowiedzialny za konkretną cechę. Z kolei w chromosomowej teorii Morgana jest to fragment chromosomu zajmujący konkretne locus na nim. Następnie w koncepcjach genetyki molekularnej jest to fragment DNA odpowiadający za łańcuch polipeptydowy, choć część biologów molekularnych uważa, iż za gen należy uznać fragment kodujący dany łańcuch polipeptydowy wraz z sekwencjami regulatorowymi, zatem gen nie jest tam *stricto* cistronem. A teraz należy zwoleńnikom selekcjonizmu genów zadać pytanie – co oni wobec tego uważają za gen, a zatem za jednostkę doboru [3, 4]? Czy mamy w ogóle do czynienia z bytem dyskretnym? Co ciekawe, jeśli chodzi o efekty fenotypowe genu, projekty genomowe wykazały, że genów organizmy posiadają często znacznie mniej niż wcześniej postulowano. Wobec wielkiej liczby białek kilkakrotnie przewyższającej liczbę genów, należy

zdać sobie sprawę, że jeden gen odpowiada za kilka łańcuchów polipeptydowych. Dzieje się tak dzięki alternatywnemu splicingowi. Zatem droga od genu do konkretnego białka jest znacznie bardziej skomplikowana niż wcześniej uważano, ze względu na szereg zjawisk związanych z edycją pre-mRNA.

Wobec tego można podważyć dyskretny charakter genu, a dyskretność jest oczekiwana od jednostki doboru naturalnego. Z tego powodu odrzucić należy również populacje i gatunki, ponieważ nie są one jasno wydzielonymi z tego punktu widzenia jednostkami, nie są one również jednoznaczne. Czy wobec alternatywnego splicingu, należy uważać, że gen jest jednostką jednoznaczną i dyskretną?

Również wobec tych faktów należy się zastanowić, czy istnieje jednoznaczny przekład genów na morfologię. Wiadomo bowiem, że istnieją pewne geny nadrzędne jak Pax6, które są zresztą mocno konserwowane ewolucyjnie. Jednakże za rozwój jednego organu czy układu narządów odpowiada tysiące genów, zatem nie można mówić jednoznacznie np. o genie dłoni. Zatem na poziomie działania można podważyć dyskretność genu jako jednostki doboru. Co ciekawe, na ten fakt zwrócił uwagę już Gould. A jeżeli już w przypadku morfologii jest problem, to co z jej epifenomenami jak szereg procesów fizjologicznych czy zachowania.

Dyskretność genu jako jednostki można podważyć również w inny sposób. A jak mają łańcuch polinukleotydowy wyróżnić gen? Tutaj pojawia się problem z ORF-ami, ponieważ przesuwają

jąc ramkę odczytu o jeden nukleotyd można zmienić ich układ. Samo istnienie ORF-ów podważa dyskretny charakter genu, ponieważ sposób wyróżnienia tej jednostki na poziomie samego łańcucha DNA w tym momencie zależy w dużej mierze od sprawności narzędzi bioinformatycznych.

Jaka może zatem być linia obrony selekcyjonizmu genów? Można zawsze spróbować wykazać niedyskretny charakter organizmu. Lecz w przypadku wielu zwierząt wyróżnienie pojedynczego organizmu nie sprawia problemów, widząc człowieka, sarnę czy psa, wiemy, że mamy do czynienia z pojedynczym organizmem jako pewną funkcjonalną całością [4]. Można oczywiście tutaj rozwijać wątek, jak definiować organizm, czy np. mikrobiom jest częścią organizmu, czy już nie jest, co w przypadku chimer i mozaik, czy są one jednym organizmem, czy też zlepkiem dwóch organizmów, lecz te rozważania należą prędkiej do dziedziny filozofii przyrody aniżeli do biologii ewolucyjnej. Praktyczny biolog traktuje organizm jako pewną funkcjonalną i jasno oddzieloną całość, prędkiej zastosuje definicje Bernarda i Cannona związane z *milieu interieur* i homeostazą niż będzie wchodzić w nianse związane ze strukturą poszczególnych elementów organizmu, ewentualnych symbiontów, pasożytów *et cetera*. Dawkins oczywiście próbuje przywoływać różne dość mętne koncepcje – jak intraselekcja, które należą już do historii myśli ewolucyjnej.

## **O pochodzeniu życia i zonglowaniu koncepcjami biogenezy**

Dawkins – być może, aby nadać pewne walory literackie swoim książkom – odwołuje się do początków życia na Ziemi. Zauważa, iż musiał istnieć pewien punkt zero, w którym się cały scenariusz rozpoczął. Dla niego życie rozpoczyna się od replikatorów, które następnie budują dla siebie ciała, aż w końcu te ciała stają się prawdziwymi barokowymi konstrukcjami świata organicznego – takimi są wielokomórkowe organizmy [3, 4]. Scenariusz zwodniczo prosty, lecz można zauważyć tutaj jedno. Dawkins bardzo chętnie zongluje różnymi koncepcjami pochodzenia życia, stwierdził w odpowiedzi na zarzuty oponentów, iż mógłby odwołać się do koncepcji Eigena [3]. Czy nie byłby to jednak strzał w stopę?

Dawkins musi bowiem założyć, że życie się zaczęło od replikatorów, wówczas cały jego scenariusz przestaje spełniać wymogi stawiane hipotezom – mianowicie oszczędności stwierdzeń wyłożonej w postaci brzytwy Ockchama. Część koncepcji przezeń przywoływanych jak świat RNA oraz montmorylonit jako matryca do syntezy makrocząsteczek poniekąd się zgadza z jego przewidywaniami [3, 4, 9]. Poszczególne teorie biogenezy rodzą jednakże wiele zastrzeżeń [8, 9]. Choćby te umiłowane przez Dawkinsa koncepcje skupiające się na roli replikatora kompletnie nie tłumaczą, skąd się wzięły dwubłony lipidowe oraz metabolizm. Wystarczy przyjąć występowanie koacerwatów, a tam powstanie pierwotnego metabolizmu – w kroplach zawieszonych w atmosferze lub w pumeksie wulkanicznym, wówczas



replikator nie znajduje tu żadnego zastosowania. Życie wówczas wystartowałoby z poziomu zbliżonego do organizmalnego, a następnie wyewoluowało w organizmy. Należałoby wówczas zadawać pytania w odwrócony sposób: a dlaczego to organizm wynalazł DNA, a nie jak Dawkins – że dlaczego to replikator stworzył sobie nośnik [4]. Czy pierwszy był metabolizm, czy materiał genetyczny – jest to problem do tej pory nie rozstrzygnięty. Można powiedzieć, że na fali pewnej mody w koncepcjach biogenezy wielką furorę robi RNA, mimo że składa się ono ze znacznie mniejszej liczby składników niż np. białka. Tak samo, dlaczego nie rozważany jest wariant koacerwatów i ewolucji komórki ze znacznie bardziej złożonego układu już supramolekularnego?

Dodać należy, że istnieją koncepcje biogenezy, które na gruncie termodynamiki i cybernetyki zakładają początek życia w postaci układu szeregu reakcji o autokatalitycznym charakterze w układzie oddzielonym błoną (chemoton). W zasadzie nie ma tu miejsca dla żadnych replikatorów.

Dawkins również sam sobie strzela w kolano, przyjmując tak wielką dowolność w dziedzinie koncepcji biogenezy. Jest tutaj pewna niekonsekwencja, dla niego świat żywy – lub ściślej mówiąc, prebiotyczny – zaczął się od samopowielających się cząsteczek. A co w przypadku, kiedy zacząłby się od układów już bardziej złożonych wyłaniających się z roztworów koloidalnych zupy pierwotnej? Wówczas koncepcje replikatorów nie miałyby odpowiedniej podbudowy i na-

leżałoby dowodzić ich w inny sposób, prawdopodobnie wywodzący się z dziedzin naukowych zainteresowań Dawkinsa (etologia, ekologia ewolucyjna) [3, 4, 11].

### **Zagadnienie adaptacjonizmu**

Dawkins przedstawia siebie jako adaptacjonistę [4, 5]. Z punktu widzenia dziedziny, na której wyrósł i ewolucyjnego doń podejścia – a mowa tutaj o zachowaniach zwierząt, jest to założenie niezwykle wygodne. Selekcjonizm genów również staje się tutaj jednym z narzędzi obrony adaptacjonizmu, ponieważ jest to panselekcjonizm *sensu stricte*. Ponieważ każda cecha organizmu jest determinowana genetycznie, gen jest jednostką doboru, zatem nie sposób byłoby nie uznawać adaptacjonizmu. Będąc ekologiem ewolucyjnym lub etologiem można się z tymi zagadnieniami zgadzać, ponieważ zachowania zwierząt mają uzasadnienia adaptacyjne, podobnie jak szereg cech powstałych na skutek doboru płciowego (jak jaskrawe ubarwienie samców wielu gatunków ptaków) [1, 3, 4]. Na gruncie morfologii i filogenezy adaptacjonizm został jednakże pogrzebany już w latach 60. i 70. [7], już nie mówiąc, że adaptacjonizm jako taki może podważać w ogóle sens badań filogenetycznych czy z dziedziny morfologii porównawczej – skoro dobór naturalny jest wszechmocny, to dlaczego wszystko nie mogłoby ewoluować ze wszystkiego? Dawkins się z takimi stwierdzeniami nie zgadza [4], lecz to jasno wynika z założeń jego koncepcji.

Poza tym zakładając jasne przełożenie

się genów na organizm oraz panselkcjonizm, to dlaczego nie założyć by drogi odwrotnej – od części organizmu do genu. Adaptacjonizm w ten sposób staje się wewnętrznie sprzeczny, ponieważ takie poglądy głosili neolamarckiści i inni zwolennicy dziedziczenia cech nabytych. Warto mieć to na uwadze, ponieważ Dawkins lubi informatyczne czy robotyczne analogie [3, 4, 6]. Lecz prawdopodobnie, kiedy dojdzie do ewolucji cybernetycznej, jej mechanizm nie musi być wcale darwinowski.

Zakładając adaptacjonizm – a zatem koncepcje Dawkinsa – należy się zastanowić, czy nie odrzucają one całego aspektu historycznego. Z punktu widzenia jest on kompletnie nieistotny [3]. O ile morfologia i filogeneza potrafiły adaptacjonizm odrzucić, o tyle badania behawioralne i ekologiczne czekają na swoistą rewolucję. Z tym że prawdopodobnie będzie się to wiązać z odrzuceniem całego dorobku Dawkinsa.

## Podsumowanie

Koncepcje Dawkinsa zawładnęły wyobraźnią wielu biologów i adeptów nauk przyrodniczych. W przypadku jednakże replikatorów oraz selekcjonizmu genów należy sobie zdać problem, że w świetle współczesnej wiedzy przyrodniczej są one mocno uprosz-

czone, jeżeli nie anachroniczne. Wiele zarzutów wysuwanych jeszcze w latach 70. i 80. zyskało na mocy dzięki osiągnięciom bardzo różnych działów nauk o życiu. Poglądy Dawkinsa z pewnością mogły zapłodnić wiele umysłów w dziedzinach przyrodoznawstwa. Są one również pewnym świadectwem heroicznej epoki początków ekologii ewolucyjnej w latach 60. i 70. [1, 3, 4, 7, 8, 11] Należy jednak sobie zdać sprawę, że tracą one obecnie myśkłą. W tym momencie można zestawić Richarda Dawkinsa z innym wpływowym intelektualistą, Noamem Chomskym. Jego koncepcja gramatyki uniwersalnej również stała się anachroniczna, lecz przyczyniła się do wielu poszukiwań i niejednej ognistej filipiki. Podobnie jest z Dawkinsem – samolubny gen z pewnością wielu skierował na tory nauk biologicznych, spowodował zainteresowanie tematyką, również skierował część wysiłków badaczy, lecz ostatecznie okazuje się mieć tyle wspólnego z rzeczywistością co uniwersalna gramatika.

Co ciekawe, obydwaj są obecnie najbardziej znani jako *de facto* polityczni aktywiści. Fakt ten można oceniać jako co najmniej smutny z punktu widzenia roli ich idei jako poważnego motoru rozwoju w gmachach biologii ewolucyjnej (przypadek Dawkinsa) i lingwistyki (*casus* Chomsky'ego).

## Bibliografia:

- [1] Davies N. B., i wsp., Wprowadzenie do ekologii behawioralnej, Wyd. PWN, 1999.
- [2] Dawkins R., Ślepy zegarmistrz, Wyd. PIW, 1992.

- [3] Dawkins R., Samolubny gen, Wyd. Prószyński i S-ka, 1996.
- [4] Dawkins R., Fenotyp rozszerzony. Dalekosieźny gen, Wyd. Prószyński i S-ka, 2002.

- [5] Dawkins R., Rozplatanie tęczy. Nauka, wiara i apetyt na cuda, Wyd. Prószyński i S-ka, 2004.
- [6] Dawkins R., Rzeka genów. Darwinowski obraz życia, Wyd. CIS, 2007.
- [7] Gould S. J., Niewczesny pogrzeb Darwina, Wyd. Prószyński i S-ka, 1999.
- [8] Hoffman A., Wokół ewolucji, Wyd. PIW, 1989.
- [9] Stewart I. i wsp., Wytwory rzeczywistości. Ewolucja umysłu ciekawego, Wyd. Prószyński i S-ka, 2003.
- [10] Szymborski K., Poprawka z natury. Biologia, kultura i seks, Wyd. Prószyński i S-ka, 1999.
- [11] Wilson E. O., Socjobiologia. Nowa Synteza, Wyd. Zysk i S-ka, 2000.
- [12] Wilson E. O., Konsiliencja. Jedność wiedzy, Wyd. Zysk i S-ka, 2003.
- [13] Wright R., Moralne zwierzę, Wyd. Prószyński i S-ka, 2004.

# Publikacja w Acta Mygenica XII

Zachęcamy do publikacji w kolejnym numerze Zeszytów Naukowych "Acta Mygenica" Koła Naukowego Studentów Biotechnologii "Mygen". Akceptujemy artykuły przeglądowe i badawcze o tematyce z zakresu lifescience. Najlepsze z nadesłanych artykułów zostaną opublikowane w XI wydaniu "Acta Mygenica" we **wrześniu 2017**.

W razie pytań prosimy o kontakt z redaktorem naczelną Dobrochną Dolicką (dobrochna\_d@wp.pl).

Poprzednie edycje zeszytów naukowych „Acta Mygenica” są dostępne pod adresem:

[www.mygen.wbbib.uj.edu.pl/dzialalnosc/actamygenica](http://www.mygen.wbbib.uj.edu.pl/dzialalnosc/actamygenica)

